Mercodia Insulin ELISA

Directions for Use
Mode d'emploi
Instruzioni per l'uso
Bruksanvisning
Gebrauchsinformation
Instrucciones para el uso
Brugsanvisning

10-1113-01
Reagents for 96 determinations

10-1113-10
Reagents for 10 x 96 determinations



Manufactured by/Hersteller/Fabriqué par/
Fabricado por/Prodotto da/Fremstillet af/
Tillverkad av

Mercodia AB, Sylveniusgatan 8A,
SE-754 50 Uppsala,
Sweden, Schweden, Suède, Suecia, Svezia, Sverige

Mercodia

EXPLANATION OF SYMBOLS USED ON LABELS/ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN/EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES/EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS/SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE/FORKLARING AF SYMBOLER ANVENDT PÅ ETIKETTER/FÖRKLARING AV SYMBOLERNA SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA

Σ (triangle symbol) Σ = **96**	Reagents for 96 determinations Reagenzien für 96 Bestimmungen Réactifs pour 96 mesures Reactivos para 96 determinaciones Reagenti per 96 rilevazioni Reagens til 96 bestemmelser Reagenser för 96 bestämningar
	Expiry date Verfallsdatum A utiliser avant Fecha de caducidad Data di scadenza Udløbsdato Utgångsdatum
	Store between 2–8°C Lagerungstemperatur 2–8°C A conserver entre 2 et 8°C Conservar a entre 2–8°C Conservare tra i 2–8° C Opbevar ved 2–8°C Förvara vid 2–8°C
LOT	Lot No. Lot Nr. N° de lot Nº lote Lotto n. Partinr. Lotnr.
IVD	For *in vitro* diagnostic use Zum Gebrauch in der *in vitro*-Diagnose Ce kit est réservé à l'utilisation diagnostique *in vitro* Para uso diagnóstico *in vitro* Per l’uso diagnostico *in vitro* Til *in vitro*-diagnosticering För *in vitro* diagnostiskt bruk

INTENDED USE

Mercodia Insulin ELISA provides a method for the quantitative determination of human insulin in serum or plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Insulin is the principal hormone responsible for the control of glucose metabolism. It is synthesized in the ß-cells of the islets of Langerhans as the precursor, proinsulin, which is processed to form C-peptide and insulin. Both are secreted in equimolar amounts into the portal circulation. The mature insulin molecule comprises two polypeptide chains, the A chain and B chain (21 and 30 amino acids respectively). The two chains are linked together by two inter-chain disulphide bridges. There is also an intra-chain disulphide bridge in the A chain.

Secretion of insulin is mainly controlled by plasma glucose concentration, and the hormone has a number of important metabolic actions. Its principal function is to control the uptake and utilization of glucose in peripheral tissues via the glucose transporter. This and other hypoglycaemic activities, such as the inhibition of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis are counteracted by the hyperglycaemic hormones including glucagon, epinephrine (adrenaline), growth hormone and cortisol.

Insulin concentrations are severely reduced in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and some other conditions such as hypopituitarism. Insulin levels are raised in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), obesity, insulinoma and some endocrine dysfunctions such as Cushing's syndrome and acromegaly.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Mercodia Insulin ELISA is a solid phase two-site enzyme immunoassay. It is based on the direct sandwich technique in which two monoclonal antibodies are directed against separate antigenic determinants on the insulin molecule. During incubation insulin in the sample reacts with peroxidase-conjugated anti-insulin antibodies and anti-insulin antibodies bound to microtitration well. A simple washing step removes unbound enzyme labelled antibody. The bound conjugate is detected by reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The reaction is stopped by adding acid to give a colorimetric endpoint that is read spectrophotometrically.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use.
- The contents of this kit and their residues must not be allowed to come into contact with ruminating animals or swine.
- The Stop solution in this kit contains 0.5 M H_2SO_4. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals.
- All patient speciments should be handled as of capable of transmitting infections.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Pipettes for 25, 50, 100, 200 and 1000 µl (repeat pipettes preferred for addition of enzyme conjugate solution, Substrate TMB and Stop Solution)
- Beakers and cylinders for reagent preparation
- Redistilled water
- Microplate reader (450 nm filter)
- Plate shaker (The recommended velocity is 700-900 cycles per minute, orbital movement)
- Microplate washing device

REAGENTS 1 X 96

Each Mercodia Insulin ELISA kit (10-1113-01) contains reagents for 96 wells, sufficient for 42 samples and one calibrator curve in duplicate. For larger series of assays, use pooled reagents from packages bearing identical lot numbers. The expiry date for the complete kit is stated on the outer label. The recommended storage temperature is 2–8°C.

Coated Plate (mouse monoclonal anti-insulin) For unused microplate wells completely reseal the bag using adhesive tape and use within two months.	1 plate 8-well strips.	96 wells	Ready for use
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Concentration indicated on vial label (recombinant human insulin) Color coded yellow	5 vials	1000 µl	Ready for use
Calibrator 0 Color coded yellow	1 vial	5 ml	Ready for use
Enzyme Conjugate 11X (peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-insulin)	1 vial	1.2 ml	Preparation, see below
Enzyme Conjugate Buffer Color coded blue	1 vial	12 ml	Ready for use
Wash Buffer 21X Dilute with 1000 ml redistilled water to make wash solution Storage after dilution: 2–8°C for 4 weeks.	1 bottle	50 ml	
Substrate TMB Colorless solution *Note! Light sensitive!*	1 vial	22 ml	Ready for use
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 vial	7 ml	Ready for use

Preparation of enzyme conjugate solution

Prepare the needed volume of enzyme conjugate solution by dilution of Enzyme Conjugate 11X, (1+10) in Enzyme Conjugate Buffer according to the table below. When preparing enzyme conjugate solution for the whole plate, pour all of the Enzyme Conjugate Buffer into the Enzyme Conjugate 11X vial. Mix gently. Use within one day.

Number of strips	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strips	1 vial	1 vial
8 strips	700 µl	7.0 ml
6 strips	500 µl	5.0 ml
4 strips	350 µl	3.5 ml

REAGENTS 10 X 96

Each Mercodia Insulin ELISA kit (10-1113-10) contains reagents for 10 × 96 wells, sufficient for 42 samples and one calibrator curve in duplicate on each plate. For larger series of assays, use pooled reagents from packages bearing identical lot numbers. The expiry date for the complete kit is stated on the outer label. The recommended storage temperature is 2–8°C.

Coated Plate (mouse monoclonal anti-insulin) For unused microplate wells completely reseal the bag using adhesive tape and use within two months.	10 plates 8-well strips	96 wells	Ready for use
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Concentration indicated on vial label (recombinant human insulin) Color coded yellow	5 vials	1000 µl	Ready for use
Calibrator 0 Color coded yellow	1 vial	5 ml	Ready for use
Enzyme Conjugate 11X (Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-insulin)	1 vial	12 ml	Preparation, see below
Enzyme Conjugate Buffer Color coded blue	1 bottle	120 ml	Ready for use
Wash Buffer 21X	2 bottle	200 ml	Preparation, see below
Substrate TMB Colorless solution*Note! Light sensitive!*	1 bottle	220 ml	Ready for use
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 bottle	70 ml	Ready for use

Preparation of enzyme conjugate solution

Prepare the needed volume of enzyme conjugate solution by dilution of Enzyme Conjugate 11X, (1+10) in Enzyme Conjugate Buffer according to the table below. Mix gently. Use within one day.

Number of plates	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
10 plates	1 vial	1 bottle
5 plates	5.0 ml	50 ml
3 plates	3.0 ml	30 ml
2 plates	2.0 ml	20 ml
1 plate	1.0 ml	10 ml

Preparation of wash solution

Prepare the needed volume of wash solution by diluion of Wash Buffer 21X in redistilled water (1+20) according to the table below. Mix properly.

Number of plates	Wash Buffer 21X	Redistilled water
10 plates	2 bottles	8000 ml
5 plates	180 ml	3600 ml
3 plates	110 ml	2200 ml
2 plates	70 ml	1400 ml
1 plate	35 ml	700 ml

Storage after dilution: 2–8°C for 4 weeks.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Serum

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate the serum by centrifugation. Samples can be stored at 2–8°C up to 24 hours. For longer periods, store samples at –20˚C. Avoid repeated freezing and thawing.

Plasma

Collect blood by venipuncture into tubes containing heparin or EDTA as anticoagulant, and separate the plasma fraction. Samples can be stored at 2–8°C up to 24 hours. For longer periods store samples at –20˚C. Avoid repeated freezing and thawing.

Preparation of samples

No dilution is normally required, however, samples containing >200 mU/l should be diluted 1+9 v/v with Calibrator 0.

TEST PROCEDURE

All reagents and samples must be brought to room temperature before use.
Prepare a calibrator curve for each assay run.

1. Prepare enzyme conjugate solution and wash solution.
2. Prepare sufficient microplate wells to accomodate Calibrators and samples in duplicate.
3. Pipette 25 µl each of Calibrators and samples into appropriate wells.
4. Add 100 µl of enzyme conjugate solution to each well.
5. Incubate on a plate shaker (700-900 rpm) for 1 hour at room temperature (18–25°C).
6. Wash 6 times with 700 µl per well using an automatic plate washer with overflow-wash function. Do not include soak step in washing procedure.
   Or manually,
   Discard the reaction volume by inverting the microplate over a sink. Add 350 µl wash solution to each well. Discard the wash solution, tap firmly several times against absorbent paper to remove excess liquid. Repeat 5 times. Avoid prolonged soaking during washing.
7. Add 200 µl Substrate TMB into each well
8. Incubate for 15 minutes at room temperature (18–25°C).
9. Add 50 µl Stop Solution to each well.
   Place plate on a shaker for approximately 5 seconds to ensure mixing.
10. Read optical density at 450 nm and calculate results.
    Read within 30 minutes.

Note! To prevent contamination between the conjugate and substrate, separate pipettes are recommended.

INTERNAL QUALITY CONTROL

Commersial controls such as Mercodia Diabetes antigen control (Code No. 10-1134-01 10-1164-01) and/or internal serum pools with low, intermediate and high insulin concentration should routinely be assayed as unknowns, and results charted from day to day. It is good laboratory practice to record the following data for each assay: kit lot number; reconstitution date of components; OD values for the blank, Calibrators and controls.

CALCULATION OF RESULTS

Computerized calculation

The concentration of insulin is obtained by computerized data reduction of the absorbance for the Calibrators, except for Calibrator 0, versus the concentration using cubic spline regression.

Manual calculation

1. Plot the absorbance values obtained for the Calibrators, except for Calibrator 0, against the insulin concentration on a log-log paper and construct a calibrator curve.
2. Read the concentration of the unknown samples from the calibrator curve.

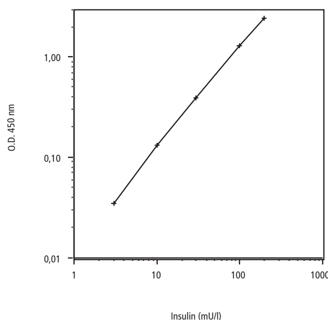
Example of results

Wells	Identity	A_{450}	Mean conc. mU/l
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	0.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Unknown 1	0.222/0.214	11.1
2 G–H	Unknown 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Unknown 3	1.941/1.978	153

* Concentration indicated on vial label.

Example of calibrator curve

A typical calibrator curve is shown here. Do not use this curve to determine actual assay results.



English

Conversion factor

1 µg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical findings have been evaluated.

Application of this test to individuals already undergoing insulin therapy is complicated by formation of anti-insulin antibodies that are capable of interfering in the assay.

Grossly lipemic, icteric or hemolysed samples do not interfere in the assay.

EXPECTED VALUES

Good practice dictates that each laboratory establishes its own expected range of values. The following results may serve as a guide until the laboratory has gathered sufficient data of its own.

Fasting levels for 137 tested, apparently healthy individuals, yielded a mean of 9.2 mU/l, a median of 6.9 mU/l and a range, corresponding to the central 95% of the observations, of 2–25 mU/l.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Detection limit

The detection limit is 1 mU/l calculated as two standard deviations above the Calibrator 0.

Recovery

Recovery upon addition is 94–113% (mean 104%).

Hook effect

Samples with a concentration of up to 30 000 mU/l can be measured without giving falsely low results.

Precision

Each sample was analyzed in 6 replicates on six different occasions.

Sample	Mean value mU/l	Coefficient of variation within assay %	between assay %	total assay %
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Specificity

The following crossreactions have been found:

C-peptide	< 0.01%
Proinsulin	< 0.01%
Proinsulin des (31-32)	< 0.5%
Proinsulin split (32-33)	< 0.5%
Proinsulin des (64-65)	98%
Proinsulin split (65-66)	56%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003%
Insulin aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rat insulin	0.7%
Mouse insulin	0.3%
Porcine insulin	374%
Sheep insulin	48%
Bovine insulin	31%

CALIBRATION

Mercodia Insulin ELISA kit is calibrated against 1st International Reference Preparation 66/304.

WARRANTY

The performance data presented here was obtained using the procedure indicated. Any change or modification in the procedure not recommended by Mercodia AB may affect the results, in which event Mercodia AB disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and fitness for use.

Mercodia AB and its authorised distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

REFERENCES

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F. (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16:179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-105454

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742-2748

Deutsch

ZIELSETZUNG

Mercodia Insulin ELISA bietet eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Insulin in humanem Serum oder Plasma.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTES

Insulin ist das bedeutendste Hormon, das für die Kontrolle des Glukosestoffwechsels verantwortlich ist. Es wird in den β-Zellen der langerhans´schen Inselzellen gebildet. Ebenso die Vorstufe Proinsulin, welche in C-Peptide und Insulin umgeformt wird. Sowohl Insulin als auch C-peptide werden in gleichmolaren Mengen in das Verdauungssystem sekretiert. Das ausgereifte Insulinmolekül besteht aus zwei Polypeptidketten, der A-Kette und der B-Kette (21 respektive 30 Aminosäuren). Die zwei Ketten sind durch zwei Interketten-Disulphidbrücken miteinander verbunden. In der A-Kette befindet sich ebenfalls eine Intraketten-Disulphidbrücke.

Die Sekretion des Insulins wird hauptsächlich durch die Glukosekonzentration im Plasma kontrolliert. Dabei hat das Hormon eine Anzahl wichtiger Funktionen im Metabolismus. Seine hauptsächliche Funktion ist die Absorption und die Verwertung der Glukose im peripheren Gewebe via Glukosetransport. Hyperglykämische Hormone wie das Glukagon, Epinephrin (Adrenalin), Wachstumshormone und Kortisol wirken hypoglykämischen Aktivitäten entgegen, wie der Inhibition der Glukoneogenese und der Glykogenolyse.

Die Insulinkonzentration im Blut ist in der insulinabhängigen Diabetes Mellitus (IDDM) und unter einigen anderen Bedingungen, wie der Hypopituitarism, beträchtlich reduziert. Insulin ist erhöht bei nicht-insulinabhängiger Diabetes Mellitus (NIDDM), Obesität, Insulinoma und einigen endokrinen Disfunktionen wie das Cushing´s Syndrom und Acromegaly.

DAS TESTPRINZIP

Mercodia Insulin ELISA ist ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit einer Festphase. Der Test basiert auf der direkten Sandwich-technik, in welcher zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen im Insulinmolekül gerichtet sind. Während der Inkubation reagiert das Insulin in der Probe mit den Insulin-Antikörpern im Peroxidase-Konjugat und den Insulin-Antikörpern, welche auf der Mikrotitierplatte gebunden sind. Eine einfache Waschung entfernt die ungebundenen, enzymatisch gekennzeichneten Antikörper. Das gebundene Konjugat wird durch 3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine (TMB) sichtbar gemacht. Durch Zugabe von Säure wird die Reaktion gestoppt. Der dadurch erhaltene colometrische Endpunkt wird nun spektrophotometrisch abgelesen.

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zum Gebrauch in der *in vitro* Diagnostik. Nicht für innere oder äußere Anwendung bei Mensch und Tier.
- Der Inhalt dieses Kits darf nicht in Kontakt mit Wiederkäuern oder Schweinen kommen.
- Die Stop Solution in diesem Kit enthält 0.5 M H_2SO_4. Bitte Routinevorkehrungen für gefährliche Chemikalien beachten!
- Für sämtliche Patientenproben sollten die Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- 25, 50, 100, 200 und 1000 µl (vorzugsweise Mehrfachpipetten für die Zugabe der Enzymkonjugatlösung, des TMB Substrates und der Stop Solution)
- Becherglas und Messzylinder für die Aufbereitung der Reagenzien.
- Doppelt destilliertes Wasser
- Mikroplattenleser (450 nm Filter)
- Plattenschüttler (Die empfohlene Geschwindigkeit liegt bei 700-900 Umdrehungen pro Minute, Orbitalbewegung)

REAGENZIEN 1 X 96

Jedes Mercodia Insulin ELISA (10-1113-01) Kit enthält Reagenzien für 96 Brunnen. Dies reicht aus für 42 Proben und eine Kalibratorkurve im Duplikat. Für größere Assay-Serien ist es empfehlenswert Reagenzien, die miteinander vermischt werden sollen, aus Packungen mit der selben Lot Nummer anzuwenden. Das Haltbarkeitsdatum für das komplette Kit ist auf dem Etikett der Packung vermerkt. Die empfohlene Lagerungstemperatur ist 2–8°C.

Coated Plate	1 Platte	96 Brunnen	gebrauchsfertig
(Maus Anti-Insulin monoklonal)	8 Brunnen-Strips		
Die unbenutzten Mikrotitierstreifen können in der mit Klebstreifen wiederverschlossenen Originalverpackung zwei Monate lang aufbewahrt werden.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5	5 Fläschchen	1000 ul	gebrauchsfertig
Konzentrationen ist auf dem Fläschchen angegeben (rekombinantes Humaninsulin) Gelbfärbung			
Calibrator 0	1 Fläschchen	5 ml	gebrauchsfertig
Gelbfärbung			
Enzyme Conjugate 11X	1 Fläschchen	1.2 ml	Zubereitung s. unten
(Peroxidasekonjugiertes, monoklonales Anti-Insulin der Maus)			
Enzyme Conjugate Buffer	1 Fläschchen	12 ml	gebrauchsfertig
Blaufärbung			
Wash Buffer 21X	1 Flasche	50 ml	
Waschlösung: Verdünnen mit 1000 ml dest. Wasser Lagerung nach der Verdünnung: 4 Wochen bei einer Temperatur von 2–8°C			
TMB Substrate	1 Fläschchen	22 ml	gebrauchsfertig
Farblose Lösung. *Achtung: lichtempfindlich !*			
Stop Solution	1 Fläschchen	7 ml	gebrauchsfertig
0.5 M H_2SO_4			

Vorbereitung der Enzymkonjugatlösung

Vorbereiten der benötigten Konjugatlösung durch mischen von Enzym Conjugate 11X (1+10) mit Enzym Conjugate Buffer entsprechend der folgenden Tabelle. Während Sie die Konjugatlösung für die ganze platte vorbereiten, schütten Sie den Enzyme Conjugate Buffer komplett in das Fläschchen Enzym Conjugate 11X. Vorsichtig mischen. Innerhalb eines Tages aufbrauchen.

Deutsch

Anzahl Streifen	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 Streifen	1 Fläschen	1 Fläschen
8 Streifen	700 µl	7.0 ml
6 Streifen	500 µl	5.0 ml
4 Streifen	350 µl	3.5 ml

REAGENZIEN 10 X 96

Jeder Mercodia Insulin ELISA Kit (10-1113-10) enthält Reagenzien für 10 x 96 Brunnen. Dies reicht aus für 42 Proben und eine Kalibratorkurve im Duplikat pro Platte. Für grössere Test-Serien ist es empfehlenswert Reagenzien, die miteinander vermischt werden sollen, aus Packungen mit der selben Lot Nummer anzuwenden. Das Haltbarkeitsdatum für das komplette Kit ist auf dem Etikett der Packung vermerkt. Die empfohlene Lagerungstemperatur ist 2–8°C.

Coated Plate 10 Platte 96 Brunnen gebrauchsfertig
(Maus Anti-Insulin monoklonal) 8 Brunnen-Strips
Die unbenutzten Mikrotitierstreifen können mit Klebstreifen in der wiederverschlossenen Originalverpackung zwei Monate lang aufbewahrt werden.

Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 5 Fläschchen 1000 µl gebrauchsfertig
Konzentrationen s. Etiketten (rekombinantes Human Insulin) Gelbfärbung

Calibrator 0 1 Fläschchen 5 ml gebrauchsfertig
Gelbfärbung

Enzyme Conjugate 11X 1 Fläschchen 12 ml Zubereitung s. unten
(Peroxidasekonjugiertes, monoklonalesAnti-Insulin der Maus)

Enzyme Conjugate Buffer 1 Flasche 120 ml gebrauchsfertig
Blaufärbung

Wash Buffer 21X 2 Flaschen 200 ml Zubereitung s. unten

Substrate TMB 1 Flasche 220 ml gebrauchsfertig
Farblose Lösung. *Achtung: lichtempfindlich !*

Stop Solution 1 Flasche 70 ml gebrauchsfertig
0.5 M H_2SO_4

Vorbereitung der Enzymkonjugatlösung

Vorbereiten der benötigten Enzymkonjugatlösung durch mischen von Enzym Conjugate 11X (1+10) mit Enzym Conjugate Buffer entsprechend der folgende Tabelle. Vorsichtig mischen. Innerhalb eines Tages aufgebrauchen.

Anzahl Platten	Enzyme conjugate 11X	Enzyme Conjugate buffer
10 Platten	1 Fläschen	1 Fläschen
5 Platten	5.0 ml	50 ml
3 Platten	3.0 ml	30 ml
2 Platten	2.0 ml	20 ml
1 Platten	1.0 ml	10 ml

Vorbereitung den Waschlösung

Vorbereiten des benötigten Waschlösung Volumens durch mischen des Wash Buffer 21X mit doppelt destilliertem Wasser (1+20) entsprechend der folgenden Tabelle. Gründliches mischen erforderlich.

Anzahl Platten	Wash Buffer 21X	doppelt dest. Wasser
10 Platten	2 Flaschen	8000 ml
5 Platten	180 ml	3600 ml
3 Platten	110 ml	2200 ml
2 Platten	70 ml	1400 ml
1 Platten	35 ml	700 ml

Lagerung nach Vermischung: 4 Wochen bei einer Temperatur von 2–8°C.

PRÄPARATGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Serum

Gewinnen von Blut durch Venenpunktion, gerinnen lassen und das Serums durch Zentrifugieren abtrennen. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 2–8°C aufbewahrt werden. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von –20°C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma

Gewinnen von Blut durch Venenpunktion. Verhinderung einer Koagulation des Venenblutes durch die Zugabe von Heparin oder EDTA. Anschließend Trennung der Plasmafraktion. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 2–8°C aufbewahrt werden. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von –20°C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Vorbereitung der Proben

Normalerweise ist eine Verdünnung der Proben nicht notwendig. Liegt jedoch die Konzentration über 200 mU/l wird eine Verdünnung von 1/10 v/v mit Calibrator 0 empfohlen.

TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien müssen vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Ebenso sollte für jeden Test eine Kalibratorkurve gemacht werden.

1. Vorbereiten der Enzymkonjugatlösung und der Waschlösung.
2. Vorbereiten genügender Mikrotiterplatten für die Calibrators und die Proben im Dublikat.
3. Pipettieren von 25 µl von jedem Calibrator und der Proben in die dafür vorgesehenen Brunnen.
4. Zugabe von 100 µl Enzymkonjugatlösung in die Brunnen.
5. Inkubation auf einem Schüttler (700-900 rpm) für eine Stunde bei Raumtemperatur (18–25°C).
6. 6-mal waschen mit 700 µl pro Vertiefung unter Verwendung eines Platten-Waschautomaten mit Überlauf-Waschfunktion. Die Waschprozedur sollte keine Einwirkzeit beinhalten.
   Wird manuell gewaschen, bitte folgendermaßen vorgehen
   Reaktionsvolumen verwerfen, durch Umdrehen der Mikrotiterplatte über einem Ausgussbecken. 350 µl Waschlösung in jede Vertiefung geben. Waschlösung verwerfen und mehrmals kräftig gegen saugfähiges Papier schlagen, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. 5-mal wiederholen. Längere Einwirkzeiten während dieser Waschprozedur vermeiden.
7. Zugabe von 200 µl TMB Substrate in die Brunnen.
8. 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (18–25°C).
9. Zugabe von 50 µl Stop Solution in jeden Brunnen.
   Um eine gute Mischung von Substrate und Stop Solution zu gewährleisten, wird empfohlen, die Platte für 5 Sekunden auf den Schüttler zu stellen.
10 Messen der Absorbance bei 450 nm und auswerten.
   Das Resultat sollte innerhalb von 30 Minuten abgelesen werden.

Beachten Sie! Um Kontaminationen zwischen dem Konjugat und dem Substrat zu vermeiden, emphehlen wir Ihnen separate Pipetten zu verwenden.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Um die tägliche Gültigkeit der Resultate zu sichern ist die Verwendung von Kontrollen als Unbekannte ratsam. Dafür wird Mercodia Diabetes antigen control (Code No. 10-1164-01) empfohlen oder pathologische Proben mit tiefen, mittleren und hohen Insulinkonzentrationen. Des weiteren sollten folgende Daten für jeden Kit protokolliert werden: Lot-Nummer des Kits, Rekonstruktion der Daten der Kitkomponenten; OD-Werte der Blanke, Calibrators und Kontrollen.

Deutsch

BERECHNUNG DER RESULTATE

Computergestützte Berechnung

Es kann eine computergestützte Berechnung der Absorbanzwerte der Calibrators, ausser Calibrator 0, und deren Konzentration mit Hilfe einer cubic spline regression erfolgen.

Manuelle Berechnung

1. Einzeichnen der für die Calibrators, ausser Calibrator 0, erhaltenen Absorbanzwerte im Verhältnis zur Insulinkonzentration auf einem log-log Papier und erstellen Kalibratorkurve.
2. Die Konzentration der unbekannten Proben aus der Kalibratorkurve ablesen.

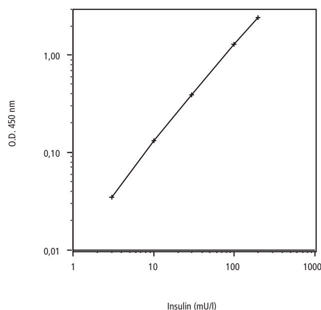
Beispiel von Resultaten

Brunnen	Identifikation	A_{450}	Mittelwert mU/l
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	0.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Unbekannte 1	0.222/0.214	11.1
2 G–F	Unbekannte 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Unbekannte 3	1.941/1.978	153

* Konzentrationen ist auf dem Fläschechn angegeben.

Beispiel einer Kalibratorkurve

Hier wird eine typische Kalibratorkurve gezeigt. Diese soll nicht zur Berechnubg aktueller Testergebnisse benutz werden.



UMRECHNUNGSFAKTOR

1 µg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei allen diagnostischen Tests sollte auch hier eine endgültige klinische Beurteilung nicht auf den Resultaten eines Einzeltests beruhen, sondern erst nach Erhalt der Ergebnisse aller klinischen und der Laborbefunde abgegeben werden.

Proben von Individuen, die einer Insulinbehandlung unterzogen wurden, können den Test stören, da in diesen Anti-Insulin Antikörper vorhanden sind.

Lipemic, Icteric oder hämolysierte Proben beeinträchtigen den Versuch nicht.

ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Referenzwerte etabliert. Die folgenden Resultate können als Richtlinie gelten, bis das Labor genügend eigene Daten gesammelt hat.

Die Werte von 137 augenscheinlich gesunden und fastenden Personen erreichten einen Mittelwert von 9.2 mU/l und einen Medianwert von 6.9 mU/l. Die Spannweite betrug 2–25 mU/l bezogen auf die zentralen 95% der beobachteten Werte.

TESTCHARAKTERISIERUNG

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze liegt bei 1 mU/l, definiert durch zwei Standardabweichnungen über dem Calibrator 0.

Wiederfindung

Die Wiederfindung nach Zugabe beträgt 94–113% (Mittelwert 104%).

Hookeffekt

Bei Proben mit einer Konzentration bis zu 30´000 mU/l wurde kein Hook-Effekt festgestellt.

Präzision

Jede Probe wurde unter 6 verschiedenen Bedingungen 6 mal gemessen.

Probe	Mittelwert	Variationskoeffizienz		
	mU/l	intra-Assay%	inter-Assay	total Assay %
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Deutsch

Spezifität

Die folgenden Kreuzreaktionen konnten festgestellt werden:

C-peptide	< 0.01%
Proinsulin	< 0.01%
Proinsulin des (31-32)	< 0.5%
Proinsulin split (32-33)	< 0.5%
Proinsulin des (64-65)	98%
Proinsulin split (65-66)	56%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003%
Insulin aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Ratteninsulin	0.7%
Mausinsulin	0.3%
Schweineinsulin	374%
Schafinsulin	48%
Rinderinsulin	31%

KALIBRIERUNG

Mercodia Insulin ELISA Kit wurde gemäss der 1st International Reference Preparation für menschliches Insulin 66/304 kalibriert.

HAFTUNG

Die hier aufgeführten Durchführungsdaten wurden mit dem indizierten Verfahren gewonnen. Jede von Mercodia AB nicht empfohlene Änderung oder Modifikation des Verfahrens kann die Resultate beeinträchtigen. In diesem Fall lehnt Mercodia AB jede explizierte, implizierte oder gesetzliche Garantie ab, die implizierte Marktfähigkeit und Anwendbarkeit inbegriffen.

Mercodia AB und deren Vertreter können dann weder für direkte Schäden noch für Folgeschäden haftbar gemacht werden.

REFERENZEN

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F. (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16:179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. Diabetes 51:2742-2748

UTILISATION PREVUE

Le test Mercodia Insulin ELISA fournit une méthode de détermination des quantités d'insuline humaine dans le sérum ou le plasma.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

L'insuline est la principale hormone impliquée dans le contrôle du métabolisme du glucose. Son précurseur, la proinsuline, est sécrété par les cellules ß des îlots de Langerhans, puis transformé pour donner des peptides C et de l'insuline, sécrétés, en quantités équimolaires, dans la circulation portale. La molécule d'insuline elle-même comprend deux chaînes de polypeptides, la chaîne A et la chaîne B (composées, respectivement, de 21 et de 30 acides aminés). Ces deux chaînes sont rattachées par deux ponts disulfure interchaînes. La chaîne A comporte également un pont disulfure intrachaîne.

L'insuline, dont la sécrétion est principalement contrôlée par la concentration de glucose plasmatique, produit plusieurs effets métaboliques importants. Sa principale fonction consiste à contrôler l'absorption et l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques, via le transporteur du glucose. Cette activé hypoglycémiante (ainsi que d'autres: inhibition de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse hépatiques) est contrebalancée par les hormones hyperglycémiantes, notamment le glucagon, l'adrénaline, l'hormone de croissance et le cortisol.

Les concentrations en insuline sont fortement réduites dans le diabète insulinodépendant (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) et dans d'autres affections telles que l'insuffisance hypophysaire. Elles sont accrues dans le diabète non insulinodépendant (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM), l'obésité, l'insulinome et quelques autres dysfonctionnements endocriniens tels que le syndrome de Cushing et l'acromégalie.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Une caractéristique du test Mercodia Insulin ELISA est le dosage immunologique enzymatique à double site, en phase solide. Il repose sur une technique de type "sandwich direct", dans laquelle deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre deux déterminants antigéniques distincts de l´insuline. En phase d´incubation, les molécules d´insuline de l´échantillon réagissent avec les anticorps anti-insuline correspondants dans le peroxidase conjugué et les anticorps anti-insuline correspondants fixés aux puits de microtitration.

Un rinçage simple élimine les anticorps marqués non liés. Le conjugué est détecté par réaction avec la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Pour arrêter la réaction, on ajoute de l'acide. Cette solution fournit un point d'évaluation colorimétrique, qui sera lu par spectrophotométrie.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Ce kit est réservé à l'utilisation diagnostique *in vitro*.
- Vous devez éviter tout contact entre le contenu ou les résidus de ce kit et les ruminants ou les suidés.
- La Stop Solution fournie contient 0,5 M d'acide sulfurique (H_2SO_4). Respectez les précautions habituelles relatives à l'utilisation de produits chimiques dangereux.
- Tous les spécimens patient doivent être traités comme des échantillons contagieux.

Français

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de 25, 50, 100, 200 et 1000 µl (pipettes à répétition recommandées pour l'ajout du conjugué enzymatique, de Substrate [TMB] et de Stop Solution)
- Béchers et éprouvettes cylindriques pour la préparation des réactifs
- Eau redistillée
- Lecteur de microplaques (filtre de 450 nm)
- Agitateur secoueur de plaques (Le régime recommandé est de 700-900 tours par minute, mouvement orbital)

RÉACTIFS 1 X 96

Chaque kit Mercodia Insulin ELISA (10-1113-01) contient suffisamment de réactifs pour 96 puits, soit une quantité permettant de traiter 42 échantillons et une courbe d'étalonnage en double. Pour des séries de dosages plus importantes, mélangez les réactifs de kits portant des numéros de lot identiques. La date de péremption du kit figure sur l'étiquette apposée à l'extérieur. La température de stockage recommandée est 2 à 8°C.

Coated Plate (Anticorps monoclonal murin anti-insuline)	1 plaque Bandes de 8 puits	96 puits	Prête à l'emploi
S'il reste des puits inutilisés, replacez-les dans leur emballage hermétiquement fermé. Utilisez ces puits sous deux mois.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Conc. indiquée sur l' etiquette (recombinant human insulin) Code couleur: jaune	5 fioles	1000 µl	Prête à l´emploi
Calibrator 0 Code couleur: jaune	1 fiole	5 ml	Prête à l'emploi
Enzyme Conjugate 11X (peroxidase conjugué monoclonal murin anti-insulin)	1 fiole	1.2 ml	A préparer voir ci-dessous
Enzyme Conjugate Buffer Code couleur: bleu	1 fiole	12 ml	Prêt à l'emploi
Wash Buffer 21X	1 flacon	50 ml	
Diluez avec 1000 ml d'eau distillée pour préparer la solution de lavage. Stockage après dilution: à température comprise entre 2 et 8°C pendant 4 semaines.			
Substrate TMB Solution incolore. *Remarque: Cette solution est sensible à la lumière !*	1 fiole	22 ml	Prêt à l'emploi
Stop Solution H_2SO_4 à 0,5 M	1 fiole	7 ml	Prête à l'emploi

Préparation du conjugué enzymatique

Préparez le volume du conjugué enzymatique nécessaire en diluant 11X l'Enzyme Conjugate (1+10) dans l'Enzym Conjugate Buffer, en suivant les indications du tableau ci-dessous. Lors de la prépara - tion du conjugué enzymatique pour une plaque entière, transférer tout le tampon du Enzyme Conjugate Buffer dans le flacon du Enzyme Conjugate 11X. Mélangez sans agiter. A uitliser dans la journée suivant la préparation.

Nombre de bandes	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 bandes	1 fiole	1 fiole
8 bandes	700 µl	7.0 ml
6 bandes	500 µl	5.0 ml
4 bandes	350 µl	3.5 ml

Français

RÉACTIFS 10 X 96

Chaque kit Mercodia Insulin ELISA (10-1113-10) contient suffisamment de réactifs pour 10 x 96 puits, soit une quantité permettant de traiter 42 échantillons et une courbe d'étalonnage en double sur chaque plaque. Pour des séries de dosages plus importantes, mélangez les réactifs de kits portant des numéros de lot identiques. La date de péremption du kit figure sur l'étiquette apposée à l'extérieur. La température de stockage recommandée est 2 à 8°C.

Coated Plate (Anticorps monoclonal murin anti-insuline)	10 plaque Bandes de 8 puits	96 puits	Prête à l'emploi

S'il reste des puits inutilisés, replacez-les dans leur emballage hermétiquement fermé. Utilisez ces puits sous deux mois.

Calibrators 1, 2, 3, 4, 5	5 fioles	1000 µl	Prête à l´emploi

Conc. indiquée sur létiquette (recombinant human insulin) Code couleur: jaune

Calibrator 0 Code couleur: jaune	1 fiole	5 ml	Prête à l'emploi
Enzyme Conjugate 11X (peroxidase conjugué monoclonal murin anti-insulin)	1 fiole	12 ml	A préparer voir ci-dessous
Enzyme Conjugate Buffer Code couleur: bleu	1 fiole	120 ml	Prêt à l'emploi
Wash Buffer 21X	2 flacon	200 ml	A préparer Voir ci-dessous
Substrate TMB	1 flacon	220 ml	Prêt à l'emploi

Solution incolore. *Remarque: Cette solution est sensible à la lumière !*

Stop Solution H_2SO_4 à 0,5 M	1 flacon	70 ml	Prête à l'emploi

Préparation du conjugué enzymatique

Préparez le volume du conjugué enzymatique nécessaire en diluant 11X l'Enzyme Conjugate (1+10) dans l'Enzym Conjugate Buffer, en suivant les indications du tableau ci-dessous. Mélangez sans agiter. A uitliser dans la journée suivant la préparation.

Nombres de plaques	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
10 plaques	1 fiole	1 flacon
5 plaques	5.0 ml	50 ml
3 plaques	3.0 ml	30 ml
2 plaques	2.0 ml	20 ml
1 plaque	1.0 ml	10 ml

Préparation la solution de lavage

Préparez le volume nécessaire la solusion de lavage en diluant 21X Wash Buffer dans l'eau distillée (1+20), en suivant les indications du tableau ci-dessous.. Mélangez correctement.

Nombre de plaques	Wash Buffer 21X	Eau redistillée
10 plaques	2 flacones	8000 ml
5 plaques	180 ml	3600 ml
3 plaques	110 ml	2200 ml
2 plaques	70 ml	1400 ml
1 plaque	35 ml	700 ml

Stockage après dilution: à temperature comprise entre 2-8ºC pendant 4 semaines.

COLLECTE ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

Sérum

Collectez le sang par ponction veineuse, attendez la coagulation, puis isolez le sérum par centrifugation. Les échantillons peuvent être stockés jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 2 et 8°C. Pour les conserver plus longtemps, stockez-les à –20°C. Evitez de les congeler et de les décongeler plusieurs fois.

Plasma

Collectez le sang par ponction veineuse dans des tubes contenant de l'héparine ou de l'EDTA comme anticoagulant et isolez le plasma. Les échantillons peuvent être stockés jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 2 et 8°C. Pour les conserver plus longtemps, stockez-les à –20°C. Evitez de les congeler et de les décongeler plusieurs fois.

Préparation des échantillons

En général, les échantillons n'ont pas besoin d'étre dilués; toutfois, ceux dont la concentration est supérieure á 200 mU/l doivent dilués 1+9 v/v avec le Calibrator 0.

PROCÉDURE DE TEST

Tous les réactifs et échantillons doivent être mis à température ambiante avant utilisation. Préparez une courbe de Calibrator pour chaque dosage.

1 Preparez la solution de l'enzyme conjuguée et la solution de lavage.
2 Preparez un nombre suffisant de puits de microplaques pour y loger les calibrators et les échantillons en double.
3 Pipetez 25 µl de Calibrator et d'échantillons dans les puits appropriés.
4 Ajoutez 100 µl la solution de l'enzyme conjuguée dans chaque puits.
5 Laissez incuber sur un agitateur secoueur de plaques (700-900 rpm) pendant une heure á température ambiante (entre 18 et 25°C).
6 Lavez 6 fois avec 700 µl par puit avec un laveur de plaques automatique en utilisant la fonction aspiration verticale. Evitez l'étape de trempage dans la procédure de lavage.
Ou lavez manuellement :
Jetez le volume réactionnel en retournant la plaque au-dessus d'un évier. Ajoutez 350 µl de solution de lavage dans chaque puit. Jetez la solution de lavage, tapez fermement plusieurs fois sur un papier absorbant pour ôter l'excès de liquide. Répétez 5 fois.
Evitez les trempages prolongés pendant l'étape de lavage.
7 Ajoutez 200 µl de Substrate TMB.
8 Laissez incuber pendant 15 minutes à température ambiante (18 et 25°C).
9 Ajoutez 50 µl de Stop Solution dans chaque puits.
Placez la plaque sur un agitateur secoueur pendant environ 5 secondes, afin que le mélange s'effectue bien.
10 Lisez la densité optique à 450 nm et calculez les résultats.
La lecture doit être réalisée sous 30 minutes.

Note: Pour éviter les contaminations du conjugué avec le substrat, il est recommandé d'utiliser des pipettes différentes.

CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Les contrôles disponibles dans le commerce, tels que le Mercodia Diabetes antigen control (référence 10-1134-01/10-1164-01), ou les mélanges de sérums internes dont la concentration en insuline est faible, moyenne ou élevée, doivent systématiquement être soumis à un dosage, comme des mélanges de concentration inconnue, et les résultats doivent être reportés sur un graphique journalier. C'est une bonne pratique pour un laboratoire d'enregistrer les données suivantes pour chaque dosage: numéro de lot du kit, dates de reconstitution des composants, valeurs OD du blanc, des calibrators et des contrôles.

Français

CALCUL DES RÉSULTATS

Calcul par ordinateur

Pour calculer la concentration en insuline, réduisez les données d´absorbance des Calibrators, à l'exception du Calibrator 0, comparées à la concentration, en appliquant une équation de régression de la spline cubique.

Calcul manuel

1. Placez les points correspondant aux valeurs d'absorbance obtenues pour les Calibrators, à l'exception du Calibrator 0, en fonction de la concentration d´insulin sur du papier pour graphiques logarithmiques et tracez la courbe d'étalonnage.
2. Lisez la concentration des nouveaux échantillons à partir de cette courbe.

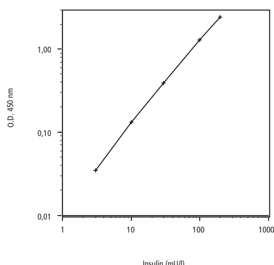
Exemple de résultats

Puits	Conc. Identité	A_{450}	moy. (mU/L)
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	0.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Nouveau 1	0.222/0.214	11.1
2 G–H	Nouveau 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Nouveau 3	1.941/1.978	153

* Conc. indiquée sur létiquette.

Exemple de courbe d’étalonnage

La courbe présentée est une courbe d’étalonnage type. Ne l’utilisez pas pour détermine les résultats de dosages réels.



FACTEUR DE CONVERSION

1 μg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Comme pour tous les tests de diagnostic, le diagnostic clinique définitif ne doit pas reposer sur les conclusions d'un seul test: il doit être effectué par le médecin après évaluation de tous les résultats cliniques.

L'application de ce test à des patients recevant déjà une insulinothérapie se complique par la formation d'anticorps anti-insuline, susceptibles d'interférer avec le dosage.

L'hémolyse, l'ictère ou la lipémie n'affectent pas le dosage.

VALEURS MOYENNES

La déontologie incite chaque laboratoire à établir sa propre gamme de valeurs. Les résultats suivants peuvent servir de guide jusqu'à ce que le laboratoire ait rassemblé suffisamment de données provenant de ses propres sources.

Un test de glycémie à jeun sur 137 individus apparemment sains donne une moyenne de 9,2 mU/l, une valeur médiane de 6,9 mU/l et une étendue de 2 mU/l à 25 mU/l (95% des observations, valeurs extrêmes exclues).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Limites de détection

La limite de la détection est inférieure à 1 mU/l (deux écarts-type au-dessus du Calibrator 0).

Récupération

Le dosage en retour donne une valeur comprise entre 94 et 113% (moyenne 104%).

Effet crochet

Le kit permet d'effectuer des mesures sur des échantillons d'une concentration maximale de 30 000 mU/l sans donner de faux résultats bas.

Précision

Chaque échantillon a été analysé en 6 exemplaires à six occasions différentes.

Echantillon	Valeur moyenne mU/l	Coefficient de variation % pendant du dosage	% entre le dosage	% total les dosages
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Français

Spécificité

Les réactions croisées ci-dessous ont été identifiées:

Peptide C	< 0.01%
Proinsuline	< 0.01%
Des (31-32) proinsulin	< 0.5%
Split (32-33)proinsulin	< 0.5%
Des (64-65) proinsulin	98%
Split (65-66) proinsulin split (65-66)	56%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003%
Insulin aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Insuline du rat	0.7%
Insuline du souris	0.3%
Insuline du porcine	374%
Insulin du mouton	48%
Insulin du boeuf	31%

ETALONNAGE

Le kit spécial Mercodia Insulin ELISA est étalonné à l'aide du réactif de 1st International Reference Preparation 66/304.

GARANTIE

Les données de performances présentées dans ce document ont été obtenues lors de tests respectant la procédure indiquée. Tout changement ou modification dans la procédure, non recommandé par Mercodia AB, est susceptible d'affecter les résultats. Si la procédure n'est pas respectée, Mercodia AB décline toute responsabilité concernant les garanties exprimées, légales ou implicites, y compris la garantie implicite relative à la qualité marchande et à la conformité d'usage de ce kit.

Mercodia AB et ses distributeurs agréés ne sauront être tenus pour passibles de dommages indirects ou immatériels si la procédure décrite n'est pas respectée.

RÉFÉRENCES

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F.(1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16:179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed trans-capillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. Diabetes 51:2742-2748

UTILIZACIÓN PREVISTA

Mercodia Insulin ELISA es un método para la determinación cuantitativa de insulina humana en suero o plasma.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La insulina es la principal hormona encargada del control del metabolismo de la glucosa. Es sintetizada por las células ß de los islotes de Langerhans como el precursor proinsulina que se procesa para formar péptido C e insulina. Ambos se secretan en cantidades equimolares a la circulación portal. La molécula de insulina madura consta de dos cadenas polipeptídicas, la cadena A y la cadena B (21 y 30 aminoácidos, respectivamente). Las dos cadenas están unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios. En la cadena A también hay un puente disulfuro intracatenario.

La secreción de insulina se controla principalmente mediante la concentración plasmática de glucosa, y la hormona tiene diversas e importantes acciones metabólicas. Su función principal es controlar la captación y utilización de glucosa en los tejidos periféricos por medio de la glucosa. Esta y otras acciones hipoglucémicas, como la inhibición de la neoglucogenesis y la glucogenolisis hepática, están contrarrestadas por las hormonas hiperglucémicas, como glucagon, adrenalina, hormona del crecimiento y cortisol.

Las concentraciones de insulina están reducidas de forma importante en la diabetes mellitus insulinodependiente (DMID) y en otras patologías como el hipopituitarismo. Los niveles de insulina están aumentados en la diabetes mellitus no insulinodependiente (DMNID), obesidad, insulinoma y algunas disfunciones endocrinas como el síndrome de Cushing y la acromegalia.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Mercodia Insulin ELISA es un inmunoensayo de fase sólida de dos puntos. Se basa en la técnica de sandwich directo según la que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos separados de la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados en peroxidasa y anticuerpos anti-insulina ligados con pocillo de microtitración.

El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado. El Enzyme Conjugate unido se detecta por reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se para añadiendo ácido para dar un punto final colorimétrico que se lee por espectrofotometría.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro.*
- El contenido de este kit y sus residuos no deben dejarse entrar en contacto con animales rumiantes o cerdos.
- Stop Solution de este kit contiene H_2SO_4 0,5 M. Seguir las precauciones rutinarias para el manejo de productos químicos peligrosos.
- Las muestras de los pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de 25, 50, 100, 200 y 1000 µl (para la adición de la disolución conjugado enzimático , Substrate TMB y Stop Solution se prefieren las pipetas de repetición)
- Cubetas y probetas para preparar los reactivos
- Agua bidestilada
- Lector de microplacas (filtro de 450 nm)
- Agitador de placas (La velocidad recommendable es de 700-900 vueltas por minuto, movimiento orbital)

REACTIVOS 1 X 96

Cada kit de Mercodia Insulin ELISA (10-1113-01) contiene reactivos para 96 pocillos, suficientes para 42 muestra y una curva de calibración por duplicado. Para series de ensayos más amplias, mezclar reactivos de paquetes de número de lote idéntico. La fecha de caducidad del kit completo está en el exterior identificada en una etiqueta. La temperatura de conservación recomendada es 2–8 ºC.

Coated plate (anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina)	1 placa 8 tiras de pocillos	96 pocillos	Listo para usar

Para los pocillos de microplacas no utilizados volver a sellar la bolsa y utilizarlos en los dos meses siguientes.

Calibrators 1, 2, 3, 4, 5	5 viales	1000 µl	Listo para usar

Concentración indicada en la etiqueta del vial
(recombinant human insulin) Codificado en amarillo

Calibrator 0 Codificado en amarillo	1 vial	5 ml	Listo para usar
Enzyme Conjugate 11X (Monoclonal de ratón Enzyme Conjugate con peroxidasa anti-insulina)	1 vial	1,2 ml	Preparación, véase a continuación.
Enzyme Conjugate Buffer Codificado en azul	1 vial	12 ml	Listo para usar
Wash Buffer 21X	1 botella	50 ml	

Diluir con 1000 ml de agua bidestilada para hacer de solución de lavado.
Conservación después de la dilución: 2–8 °C durante 4 semanas.

Substrate TMB	1 vial	22 ml	Listo para usar

Solución incolora. *Atención Es sensible a la luz !*

Stop Solution 0,5 M H_2SO_4	1 vial	7 ml	Listo para usar

Preparación de la disolutión conjugado enzimático

Preparar el volumen necessario disolución de conjugado enzimático por dilución del Enzyme Conjugate 11X (1+10) en Enzyme Conjugate Buffer según la siguiente tabla. Si se usa toda la placa, verter completamente el tampón Emzyme Conjugate Buffer al vial Enzyme Conjugate 11X. Mezclar suavemente. Utilizar en un dia.

Número de tiras	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 tiras	1 vial	1 vial
8 tiras	700 µl	7.0 ml
6 tiras	500 µl	5.0 ml
4 tiras	350 µl	3.5 ml

REACTIVOS 10 X 96

Cada kit de Mercodia Insulin ELISA (10-1113-10) contiene reactivos para 10x96 pocillos, suficientes para 42 muestra y una curva de calibración por duplicado. Para series de ensayos más amplias, mezclar reactivos de paquetes de número de lote idéntico. La fecha de caducidad del kit completo está en el exterior identificada en una etiqueta. La temperatura de conservación recomendada es 2–8 ºC.

Coated plate	10 placa	96 pocillos	Listo para usar

(anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina) 8 tiras de pocillos
Para los pocillos de microplacas no utilizados volver a sellar la bolsa y utilizarlos en los dos meses siguientes.

Calibrators 1, 2, 3, 4, 5	5 viales	1000 µl	Listo para usar

Conc. indicada en la etiqueta del vial (recombinant human insulin) Codificado en amarillo

Calibrator 0	1 vial	5 ml	Listo para usar

Codificado en amarillo

Enzyme Conjugate 11X	1 vial	12 ml	Preparación, véase a continuación.

(Monoclonal de ratón Enzyme Conjugate con peroxidasa anti-insulina)

Enzyme Conjugate Buffer	1 botella	120 ml	Listo para usar

Codificado en azul

Wash Buffer 21X	2 botella	200 ml	Preparación, véase a continuación
Substrate TMB	1 vial	220 ml	Listo para usar

Solución incolora. *Atención Es sensible a la luz !*

Stop Solution	1 vial	70 ml	Listo para usar

0,5 M H_2SO_4

Español

Preparación de la disolución conjugado enzimático

Preparar el volumen necessario disolución conjugado enzimático por dilución del Enzyme Conjugate 11X (1+10) en Enzyme Conjugate Buffer según la siguiente tabla. Mezclar suave mente. Utilizar en un dia.

Número de placas	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
10 placas	1 vial	1 botella
5 placas	5.0 ml	50 ml
3 placas	3.0 ml	30 ml
2 placas	2.0 ml	20 ml
1 placa	1.0 ml	10 ml

Preparation de solución de lavado

Preparar el volumen necessario solusión de lavado diluyendo el Wash Buffer 21X en agua bidestilada (1+20) según la siguiente tabla. Mezclar adecuadamente.

Nombre de placas	Wash Buffer 21X	Agua bidestilada
10 placas	2 botellas	8000 ml
5 placas	180 ml	3600 ml
3 placas	110 ml	2200 ml
2 placas	70 ml	1400 ml
1 placa	35 ml	700 ml

Conservación después de la dilución: 2–8°C durante 4 semanas.

OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Suero

Recoger la sangre por venipunción, dejar coagular y separar el suero por centrifugación. Las muestras pueden conservarse a 2–8°C hasta 24 horas. Para periodos más largos, conservar las muestras a –20°C. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Plasma

Recoger la sangre por venipunción en tubos que contienen heparina o EDTA como anti-coagulante y separar la fracción de plasma. Las muestras pueden conservarse a 2–8°C hasta 24 horas. Para periodos más largos, conservar las muestras a –20°C. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Preparación de las muestras

Normalmente no es necesario diluirlas; sin embargo, las muestras que contienen >200 mU/l deben diluirse 1+9 v/v Calibrator 0.

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN

Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de su uso. Preparar una curva de calibración para cada ensayo.

1. Preparar disolución de conjugado enzimático y de solución de lavado.
2. Preparar suficientes pocillos de microplaca para los Calibrators y muestras por duplicado.
3. Pipetear 25 µl de cada Calibrator y muestra en los pocillos correspondientes.
4. Añadir 100 µl disolución de conjugado enzimático a cada pocillo.
5. Incubar en un agitador de placas (700-900 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C).
6. Lavar 6 veces con 700 µl/pocillo mediante Lavador de placas automático con función de sobre-flujo de lavado. No usar el paso de remojo durante el proceso.
   O manualmente:
   Verter el líquido invirtiendo la microplaca en una pila. Añadir 350 µl de solución de lavado, golpeando firmemente la placa contra papel absorbente para eliminar todo el líquido en exceso. Repetir 5 veces. <u>Evitar remojo prolongado durante el proceso.</u>
7. Añadir 200 µl de Substrate TMB.
8. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18–25°C).
9. Añadir 50 µl de Stop Solution a cada pocillo.
   Colocar la placa en un agitador durante aproximadamente 5 segundos para asegurar el mezclado.
10. Leer la densidad óptica a 450 nm y calcular los resultados.
    Leer en 30 minutos.

Aviso: Usar pipetas distintas para prevenir contaminación entre conjugado y substrato.

CONTROL DE CALIDAD INTERNA

Los controles comerciales como Mercodia Diabetes antigen control (N.º de código: 10-1164-01) y/o mezclas de sueros internas con concentraciones de insulina bajas, medias y altas, se analizarán de forma rutinaria como muestras desconocidas y los resultados se representarán día a día. Es una buena práctica de laboratorio registrar los siguientes datos en cada ensayo: número de lote del kit; fechas de reconstitución de los componentes del kit, valores de DO de blanco, Calibrators y controles.

Español

CÁLCULO DE RESULTADOS

Cálculo computarizado

Para obtener la concentración de insulina puede realizarse la reducción de datos computarizados de la absorbancia para los Calibrators, sin Calibrator 0, frente a la concentración utilizando una regresión spline cúbica.

Cálculo manual

1. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Calibrators, sin Calibrator 0, frente a la concentración de insulina en papel log-log y construir una curva de calibración.
2. Leer la concentración de las muestras desconocidas a partir de la curva de calibración.

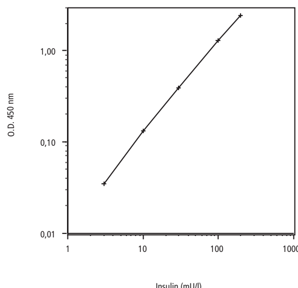
Ejemplo de resultados

Pocillos	Identidad	A_{450}	Conc. media mU/l
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	1.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Desconocida 1	0.222/0.214	11.1
2 G–H	Desconocida 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Desconocida 3	1.941/1.978	153

* Concentración indicada en la etiqueta del vial.

Ejemplo de curva de calibración

Aqui se presenta una curva de calibración típica. Esta curva no debe utilizarse para verificar resultados de un ensayo.



FACTOR DE CONVERSIÓN

1 μg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

Igual que todas las pruebas diagnósticas, un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado únicamente en los resultados de una sola prueba, sino que el médico debe hacerlo sólo después de haber evaluado todos los datos clínicos.

Es complicado realizar esta prueba en individuos que están sometidos a insulinoterapia, por la formación de anticuerpos anti-insulina que pueden interferir en el ensayo.

Las muestras lipémicas, ictéricas o hemolizadas no interfieren en el ensayo.

VALORES ESPERADOS

Una buena práctica de laboratorio dicta que cada laboratorio establezca su propio rango de valores. Los siguientes resultados pueden servir de guía hasta que el laboratorio haya reunido suficientes datos por su cuenta.

Los niveles en ayunas de 137 individuos estudiados, aparentemente sanos, dieron una media de 9,2 mU/l, una mediana de 6,9 mU/l y un rango – correspondiente al 95% central de las observaciones – de 2–25 mU/l.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite de detección

El límite de detección es 1 mU/l calculado como dos desviaciones estándar por encima del Calibrator 0.

Recuperación

La recuperación a la adición es del 94%–113% (media 104%).

Efecto gancho

Las muestras con una concentración superior a 30.000 mU/l pueden medirse sin obtener resultados falsamente bajos.

Precisión:

Cada muestra se analizó en 6 replicados en seis ocasiones diferentes.

Muestra	Valor medio mU/l	Coeficiente de variación intra-ensayo %	inter-ensayo %	total ensayo %
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Español

Especificidad

Se han hallado las siguientes reacciones cruzadas:

Péptido C	< 0.01%
Proinsulina	< 0.01%
Proinsulina des (31-32)	< 0.5%
Proinsulina split (32-33)	< 0.5%
Proinsulina des (64-65)	98%
Proinsulina split (65-66)	56%
Insulina lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003%
Insulina aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Insulina de rata	0.7%
Insulina de ratón	0.3%
Insulina porcino	374%
Insulina de oveja	48%
Insulina bovino	31%

CALIBRACIÓN

El Mercodia Insulin ELISA se calibra contra el reactivo de 1st International Reference Preparation 66/304.

GARANTÍA

Los datos de rendimiento presentados aquí se obtuvieron usando el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación en el procedimiento, no recomendado por Mercodia AB, puede afectar los resultados, en cuyo caso Mercodia AB declina cualquier responsabilidad y garantía acordada, implícita o explícita, incluso la garantía implícita sobre la comerciabilidad e idoneidad para su uso.

Mercodia AB y sus distribuidores autorizados, en tal caso, no asumirán responsabilidades por daños y perjuicios indirectos o consiguientes.

REFERENCIAS

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F. (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16:179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742-2748

USO PROPOSTO

Mercodia Insulin ELISA fornisce un metodo per la determinazione quantitativa dell'insulina umana nel siero o nel plasma.

RELAZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'insulina è il principale ormone responsabile del controllo di glucosio nel metabolismo. E' sintetizzata nelle cellule delle isolette di Langerhans come il precursore, proinsulina, che è elaborato per formare la peptide C e l'insulina. Entrambi sono secreti in una somma equimolare nel portale della circolazione. La molecola matura dell'insulina comprende due catene di polipeptide, la catena A e la catena B (rispettivamente 21 e 30). Le due catene sono legate insieme da due ponti concatenati disulfidici. C'è anche un ponte disulfidico intercatenato nella catena A.

La secrezione dell'insulina è principalmente controllata dalla concentrazione di glucosio nel plasma, e l'ormone ha un significante numero di azioni metaboliche. La sua funzione principale è di controllare il condotto e l'utilizzazione del glucosio nei tessuti periferici tramite il vettore di glucosio. Questa e le altre attività ipoglicemiche, per esempio l'inibizione di glicogenesi e glicogenolisi sono mitigate dagli ormoni iperglicemici inclusi il glucagone, l'epinefrina (adrenalina), la crescita degli ormoni e cortisolo.

Le concentrazioni di insulina sono ridotte drasticamente nei pazienti di diabete melito insulina dipendenti (IDDM) e in altre condizioni come l'ipopituitarismo. I livelli di insulina sono aumentati nei pazienti di diabete melito non insulina dipendenti (NIDDM), di obesità, insulinoma e alcune disfunzioni endocrine come la sindrome di Cushing e l'acromegalia.

PRINCIPIO DI PROCEDURA

Mercodia Insulin ELISA, è una fase concreta dell'immunoanalisi enzima due-sito.E' basata sulla tecnica diretta sandwich nella quale due anticorpi monoclonali sono diretti contro determinanti antigenici separati sulla molecola insulina.

Durante l'incubazione la insulina presente nel campione reagisce con gli anticorpi anti-iinsulina coniugati a perossidasi e gli anticorpi anti-insulina legati al pozetto per microtitolazione.

Un leggero lavaggio rimuovi indirettamente l'anticorpo Enzyme marcato. Il Conjugate diretto è scoperto dalla reazione con 3,3',5,5' – tetrametibenzidine (TMB). La reazione è fermata aggiungendo acido per dare una posizione estrema colorimetrica che è letta spettrometricamente.

PREACAUZIONI E AVVISI

- Per l'uso diagnostico *in vitro*
- I contenuti di questo kit e i suoi residui non devono essere ammessi al contatto con animali ruminanti o suini.
- La Stop Solution in questo kit contiene 0.5 M H_2SO_4. Seguire le precauzioni quotidiane di routine per maneggiare sostanze chimiche pericolose.
- Tutti i pazienti presi come campione potrebbero essere trattati come capaci di trasmettere infezioni.

Italiano

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI

- Pipette for 25, 50, 100, 200, e 1000 µl (riutilizza le pipette in dotazione per l'aggiunta della soluzione enzima coniugato, Substrate TMB e Stop Solution).
- Beakers e cilindri per la preparazione di reagenti
- Acqua ridistillata
- Lettore micro piastra (450nm filtro)
- Piastra dello shaker (La velocità raccomandata é di 700-900 giri/minuto, movimento orbitale)
- Micro piastra piano di lavaggio

REAGENTI 1 X 96

Ogni kit Mercodia Insulin ELISA (10-1113-01) contiene reagenti per 96 prove, sufficienti per 42 campioni e una calibratura curva in duplicato. Per diverse serie di analisi, usare reagenti provenienti da scatole portanti identici numeri di lotto.

La data di scadenza del kit completo è stabilita sull'etichetta all'esterno.

Si raccomanda di conservare ad una temperatura di 2–8° C.

Coated plate	1 piastra	96 pozzetti	Pronti per l'uso
(Topo monoclonale anti insulina)	8 strips per pozzetti		
I pozzetti delle micro piastre inutilizzati, devono essere risigillati e adoperati entro due mesi.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5	5 fiale	1000 µl	Pronto all´uso
Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala (recombinant human insulin) Giallo colore codificato			
Calibrator 0	1 fiala	5 ml	Pronto all'uso
Giallo colore codificato			
Enzyme Conjugate 11X	1 fiala	1.2 ml	Per la preparazione vedi sotto:
(Peroxidase Conjugate topo monoclonale Anti insulina)			
Enzyme Conjugate Buffer	1 fiala	12 ml	Pronto all´uso
Blu colore codificato			
Wash Buffer 21 X	1 bottiglia	50 ml	
Diluire con 1000 ml d'acqua ridistillata per fare di soluzione di lavaggio. Conservare dopo la diluizione: 2–8° C per 4 settimane.			
Substrate TMB	1 fiala	22 ml	Pronto all'uso
Soluzione incolore *Nota! Sensibile alla luce!*			
Stop Solution	1 fiala	7 ml	Pronto all'uso
0.5 M H_2SO_4			

Preparazione della soluzione enzima coniugato

Preparare la quantitá necessaria della soluzione enzima coniugato con la diluizione dell'Enzyme Conjugate 11X (1+10) nel Enzyme Conjugate Buffer in base alla tabella sottostante. Quando si prepara la soluzione enzima coniugato per tutta la piastra, versare tutto il tampone Enzyme Conjugate Buffer nella fiala dell'Enzyme Conjugate 11X. Mescolare lievemente. Usare entro un giorno.

Numero di strisce	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strisce	1 fiala	1 fiala
8 strisce	700 µl	7.0 ml
6 strisce	500 µl	5.0 ml
4 strisce	350 µl	3.5 ml

REAGENTI 10 X 96

Ogni kit Mercodia Insulin ELISA (10-1113-10) contiene reagenti per 10 x 96 prove, sufficienti per 42 campioni e una calibratura curva in duplicato. Per diverse serie di analisi, usare reagenti provenienti da scatole portanti identici numeri di lotto.

La data di scadenza del kit completo è stabilita sull'etichetta all'esterno.

Si raccomanda di conservare ad una temperatura di 2–8° C.

Coated plate	10 piastra	96 pozzetti	Pronti per l'uso
(Topo monoclonale anti insulina) 8 strips per pozzetti I pozzetti delle micro piastre inutilizzati, devono essere risigillati e adoperati entro due mesi.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5	5 fiale	1000µl	Pronto all´uso
Conc. indicata sull'etichetta della fiala (recombinant human insulin) Giallo colore codificato			
Calibrator 0	1 fiala	5 ml	Pronto all'uso
Giallo colore codificato			
Enzyme Conjugate 11X	1 fiala	12 ml	
(Peroxidase Conjugate topo monoclinale Anti insulina)			
Enzyme Conjugate Buffer	1 fiala	120 ml	Pronto all´uso
Blu colore codificato			
Wash Buffer 21 X	2 bottiglia	200 ml	Per la preparazione vedi sotto
Substrate TMB	1 fiala	220 ml	Pronto all'uso
Soluzione incolore. *Nota! Sensibile alla luce!*			
Stop Solution	1 fiala	70 ml	Pronto all'uso
0.5 M H_2SO_4			

Italiano

Preparazione della soluzione enzima coniugato

Preparare la quantitá necessaria della soluzione enzima coniugato con la diluizione dell'Enzyme Conjugate 11X (1+10) nel Enzyme Conugate Buffer in base alla tabella sottostante. Mescolare lievemente. Usare entro un giorno.

Numero di piastra	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
10 piastra	1 fiala	1 bottiglia
5 piastra	5.0 ml	50 ml
3 piastra	3.0 ml	30 ml
2 piastra	2.0 ml	20 ml
1 piastra	1.0 ml	10 ml

Preparazione di soluzione di lavaggio

Preparare la quantitá necessaria il tampone di lavaggio con la diluizione del Wash Buffer 21X in acqua ridistillata (1+20) in base alla tabella sottostante. Mescolare icompletamente.

Numero di piastra	Wash Buffer 21X	Acqua ridistillata
10 piastra	2 bottiglia	8000 ml
5 piastra	180 ml	3600 ml
3 piastra	110 ml	2200 ml
2 piastra	70 ml	1400 ml
1 piastra	35 ml	700 ml

Dopo la diluizione conservare a: 2–8°C per 4 settimane.

LA RACCOLTA E IL TRATTAMENTO DEL MODELLO

Il siero

Il prelievo in vena di sangue, permette di coagulare, e separare il siero con la centrifugazione. I campioni possono essere conservati a 2–8°C fino a 24 ore. Per periodo più lunghi, conservare i campioni a – 20°C. Evitare di ripetere il congelamento e lo scongelamento.

Plasma

Prelevare il sangue direttamente in vena in provette contenenti eparina o EDTA come anti-coagulante , e separare la frazione del plasma. I campioni possono essere conservati a 2–8°C fino a 24 ore. Per periodi più lunghi conservare i campioni a –20°C. Evitare di ripetere il congelamento e lo scongelamento.

Preparazione dei campioni

La diluizione non è normalmente richiesta , comunque, i campioni contenenti >200 mU/l dovrebbero essere diluiti 1+9 v/v con Calibratore 0.

PROCEDURA DEL TEST

Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. Preparare una calibratura curva per ciascuna serie di analisi

1. Preparare la soluzione enzima coniugato e di soluzione de lavaggio.
2. Preparare sufficiente pozzetti nelle micropiastre a comporre Calibrators e campione in duplice copia.
3. Pipette 25 µl per ogni Calibrators e campioni in appropriati pozzetti.
4. Aggiungere 100 µl della soluzione enzima coniugato per ogni pozzetto.
5. Mettere in incubatrice in una piastra shaker (700-900 rpm) per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C).
6. Lavare 6 volte con 700 µl per pozzetto usando un lavatore automatico per piastre con la funzione traboccare-lavare. Nella procedura di lavaggio non utilizzare la funzione immersione.

   O manualmente,

   Eliminare il volume di reazione capovolgendo la micropiastra su un lavabo. Aggiungere 350 µl di soluzione di lavaggio ad ogni pozzetto. Eliminare la soluzione di lavaggio, sbattere con forza diverse volte contro carta assorbente per rimuovere il liquido in eccesso. Ripetere 5 volte. <u>Evitare prolungate pause di immersione durante la procedura di lavaggio.</u>
7. Aggiungere 200 µl Substrate TMB.
8. Mettere in incubatrice per 15 minuti a temperatura ambiente (18-25 C).
9. Aggiungere 50 µl Stop Solution ad ogni pozzetto. Mettere la piastra in uno shaker per approssimativamente per 5 secondi per garantire la miscelazione.
10. Leggere l'assorbività a 450 nm e calcolare i risultati. Leggere entro 30 minuti.

Nota! Per evitare qualsiasi contaminazione tra coniugato e substrato devono essere usate pipette distinte.

CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

I controlli commerciali tale come il Mercodia Diabetes antigen control (codifica No. 10-1164-01) e/o il siero interno proveniente da diversi donatori con basse, intermedie e alte concentrazioni di insulina dovrebbero essere analizzate periodicamente come se fossero esterne, e i risultati tracciati di giorno in giorno. E' buona norma di un laboratorio registrare i seguenti dati per ciascuna analisi: un certo numero di kit; una ricostituzione dei dati e dei componenti del kit; i valori di OD per il modulo, Calibrators e controlli.

IL CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolo computerizzato

La riduzione dei dati computerizzati dell´assorbenza per le Calibrators, eccetto il Calibrator 0, verso la concentrazione usando un regressione cubica flessibile potrebbe essere errettuata per ottenere la concentrazione di insulina.

Calcolo manuale

1. Tracciare i valori di assorbenza ottenuti per le Calibrators, eccetto il Calibrator 0, contro la concentrazione di insulina in un registro e formula una calibratura curva.
2. Leggere la concentrazione dei campioni sconosciuti dalla calibratura curva.

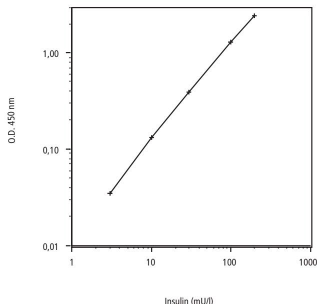
Risultati ottenuti

pozzetti	Identità	A_{450}	Conc. princ.. mU/l.
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	0.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Incognita 1	0.222/0.214	11.1
2 G–H	Incognita 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Incognita 3	0.546/0.538	153

* Concentrazione indicata sull`etichetta della fiala.

Esempio di una calibratura curva

Una calibratura rappresentativa è mostrata qui. Non usare questa curva per determinare i risultati attuali delle analisi.



IL FATTORE DI CONVERSIONE

1 µg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Come tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva non dovrebbe essere basata sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatto medico dopo averne valutate le conclusioni cliniche.

L'applicazione di questo test su individui già sottoposti a terapie di insulina è ostacolato dalla formazione di anticorpi anti-insulina, in grado di interferire nell'analisi.

Grossolanamente campioni lipemic, itterico o hemolysed non interferiscono nell'analisi.

VALORI PREVISTI

E' buona norma e pratica di ogni laboratorio stabilire una serie del tutto sua di presunti valori. I seguenti risultati potrebbero servire come guida fino a che il laboratorio abbia raccolto dati sufficienti del tutto suoi.

I livelli di digiuno per 137 esaminati, individui apparentemente sani, hanno reso un media di 9.2 mU/l, una mediana di 6.9 mU/l e una serie corrispondente al centrale 95% delle osservazioni dei 2–25 mU/l.

CARATTERISTICHE E ESECUZIONE

Il limite della scoperta

Il limite della scoperta è 1mU/l calcolato come due deviazioni standard sopra della Calibrator 0.

Riacquisto

Il riacquisto sull'aggiunta è 94–113% (significa 104%).

Hook effect

I campioni con una concentrazione sopra i 30000 mU/l può essere analizzata senza dare falsamente bassi risultati .

Precisione

Ogni campione è stato analizzato su 6 riprodotti in 6 diversi momenti.

Campioni	Valore principale	Coefficiente di variazione		
	MU/l	Nell' analisi %	Fra analisi %	Totale analisi %
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Specificità

Sono state trovate le seguenti reazioni trasversali:

C-peptide	< 0.01%
Proinsulina	< 0.01%
Proinsulina des (31-32)	< 0.5%
Proinsulina split (32-33)	< 0.5%
Proinsulina des (64-65)	98%
Proinsulina split (65-66)	56%
Insulina lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003%
Insulina aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Insulina di ratta	0.7%
Insulina di topo	0.3%
Insulina porcino	374%
Insulina di pecora	48%
Insulina bovino	31%

CALIBRATURA

Il kit specifico Mercodia Insulin ELISA è calibrato contro i Riferimenti 1st International Reference Preparation 66/304.

GARANZIA

I dati dei rendimenti presentati qui sono stati ottenuti usando le procedure indicate. Qualsiasi cambiamento o modifica nella procedura non raccomandata da Mercodia AB possono avere effetti su i risultati, nel caso in cui Mercodia rinuncia al diritto tutte le garanzie espresse, implicite o fissate, inclusa la garanzia implicita per l'uso commerciale e appropriato.

Mercodia AB e i suoi distributori autorizzati, in tal caso, non sarà soggetto a danni indiretti o consequenziali.

RIFERIMENTI

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F. (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16:179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742-2748

TILSIGTET ANVENDELSE

Mercodia Insulin ELISA er en metode til kvantitativ bestemmelse af humant insulin i serum eller plasma.

OVERSIGT OG FORKLARING AF ANALYSEN

Insulin er det vigtigste hormon i forbindelse med styring af glukosemetabolismen. Det syntetiseres i ß-cellerne i de langerhanske øer ligesom forløberen, proinsulin, der behandles for at danne C-peptid og insulin. De udskilles begge i ækvimolære mængder i portal cirkulation. Det modne insulinmolekyle består af to polypeptid-kæder, A-kæden og B-kæden (med henholdsvis 21 og 30 aminosyrer). De to kæder kædes sammen af to disulfid-broer mellem kæderne. Der er også en kædeintern disulfid-bro i A-kæden.

Insulinudskillelsen styres primært af glukosekoncentrationen i plasma, og hormonet har en række vigtige stofskiftefunktioner. Den primære funktion er at styre optagelsen og udnyttelsen af glukose i perifert væv via glukosetransporteren. Denne og andre hypoglykæmiske aktiviteter som f.eks. hæmningen af hepatisk glukoneogenese og glycogenolyse modvirkes af de hyperglykæmiske hormoner, herunder glukagon, epinephrin (adrenalin), væksthormon og cortisol.

Insulinkoncentrationer er kraftigt reduceret ved insulinafhængig diabetes mellitus (IDDM) og visse andre tilstande som f.eks. hypopituitarisme. Insulinkoncentrationen er forhøjet ved insulinuafhængig diabetes mellitus (NIDDM), fedme, insulinoma og visse endokrine dysfunktioner som f.eks. Cushings syndrom og akromegali.

PRINCIP FOR PROCEDUREN

Mercodia Insulin ELISA er en tosidet solid phase-enzymimmunanalyse. Den er baseret på den direkte sandwich-teknik, hvor to monoklonale antistoffer rettes mod separate antigene determinanter på insulin-molekylet. Under inkubation reagerer insulin i prøven med peroxydase-konjugeret anti-insulin-antistoffer og anti-insulin-antistoffer bundet til mikrotitreringsbrønden.

En enkel skylning fjerner ubundet enzym-mærket antistof. Det bundne konjugat registreres ved reaktion med 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Reaktionen stoppes ved at tilsætte syre for at give et kolorimetrisk endepunkt, der aflæses spektrofotometrisk.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til in vitro-diagnosticering.
- Indholdet af dette sæt samt rester deraf må ikke komme i kontakt med drøvtyggende dyr eller svin.
- Stop Solution i dette sæt indeholder 0,5 M H_2SO_4. Overhold almindelige forholdsregler for håndtering af farlige kemikalier.
- Alle patientprøver skal håndteres som potentielt smittefarlige.

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER

- Pipetter til 25, 50, 100, 200 og 1000 µl (repetitionspipetter foretrækkes til tilsætning af enzymkonjugatopløsning, Substrate-TMB og Stop Solution)
- Bægerglas og målebægre til klargøring af reagenser
- Redestilleret vand
- Mikropladeaflæser (450 nm-filter)
- Rystebord (Anbefalet hastighed er 700-900 omdrejninger per minut, orbital bevægelse)
- Skylleanordning til mikroplader

REAGENSER 1X96

Hvert Mercodia Insulin ELISA (10-1113-01) sæt indeholder reagenser til 96 brønde, nok til 42 prøver og en kalibratorkurve i dublet. Til større analyseserier skal der bruges puljereagenser fra pakker med samme partinummer. Udløbsdatoen for hele sættet er angivet på den yderste etiket. Den anbefalede opbevaringstemperatur er 2–8°C.

Coated plate (Monoklonalt anti-insulin fra mus)	1 plade Strimler med 8 brønde	96 brønde	Klar til brug
Ved ubrugte mikropladebrønde skal posen genforsegles og brøndene bruges inden for 2 måneder.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Koncentration angivet på hætteglassets etikett (rekombineret humant insulin) Farvekodet gul	5 hætteglas	1000 µl	Klar til brug
Calibrator 0 Farvekodet gul	1 hætteglas	5 ml	Klar til brug
Enzyme Conjugate 11X (Peroxidase-konjugeret fra mus monoklonalt Anti-insulin)	1 hætteglas	1,2 ml	Klargøring, se nedenfor
Enzyme Conjugate Buffer Farvekodet blå	1 hætteglas	12 ml	Klar til brug
Wash Buffer 21X Fortynd med 1000 ml redestilleret vand for at lave vaske opløsning. Opbevaring efter fortynding: 2–8°C i 4 uger.	1 flaske	50 ml	
Substrate TMB Farveløs opløsning *Bemærk! Lysfølsom!*	1 hætteglas	22 ml	Klar til brug
Stop Solution 0,5 M H_2SO_4	1 hætteglas	7 ml	Klar til brug

Forberedelse af enzymkonjugatopløsning

Forbered den påkrævede mængde enzymkonjugatopløsning ved at fortynde Enzyme Conjugate 11X, (1+10) i Enzym Conjugate Buffer i henhold til tabellen nedenfor. Hvis der forberedes enzymkonjugatopløsning til en hel plade, hæld hele indeholdet af Enzyme Conjugate Buffer over i Enzyme Conjugate 11X røret. Bland forsigtigt. Bruges inden 24 timer.

Antal strimler	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strimler	1 hætteglas	1 hætteglas
8 strimler	700 µl	7.0 ml
6 strimler	500 µl	5.0 ml
4 strimler	350 µl	3.5 ml

REAGENSER 10 X 96

Hvert Mercodia Insulin ELISA (10-1113-10) sæt indeholder reagenser til 10 x 96 brønde, nok til 42 prøver og en kalibreringskurve i dublet. Til større analyseserier skal der bruges puljereagenser fra pakker med samme partinummer. Udløbsdatoen for hele sættet er angivet på den yderste etiket. Den anbefalede opbevaringstemperatur er 2–8°C.

Coated plate (Monoklonalt anti-insulin fra mus)	10 plade Strimler med 8 brønde	96 brønde	Klar til brug
Ved ubrugte mikropladebrønde skal posen genforsegles og brøndene bruges inden for 2 måneder.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Konc. angivet på hætteglassets etikett (rekombineret humant insulin) Farvekodet gul	5 hætteglas	1000 µl	Klar til brug
Calibrator 0 Farvekodet gul	1 hætteglas	5 ml	Klar til brug
Enzyme Conjugate 11X (Peroxidase-konjugeret fra mus monoklonalt Anti-insulin)	1 hætteglas	12 ml	Klargøring, se nedenfor
Enzyme Conjugate Buffer Farvekodet blå	1 flaske	120 ml	Klar til brug
Wash Buffer 21X Opbevaring efter fortynding: 2–8°C i 4 uger.	2 flaske	200 ml	Klargøring, se nedenfor
Substrate TMB Farveløs opløsning *Bemærk! Lysfølsom!*	1 flaske	220 ml	Klar til brug
Stop Solution 0,5 M H_2SO_4	1 flaske	70 ml	Klar til brug

Dansk

Forberedelse af enzymkonjugatopløsning

Forbered den påkrævede mængde enzymkonjugatopløsning ved at fortynde Enzyme Conjugate 11X, (1+10) i Enzym Conjugate Buffer i henhold til tabellen nedenfor. Bland forsigtigt. Bruges inden 24 timer.

Antal plader	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
10 plader	1hætteglas	1 flaske
5 plader	5.0 ml	50 ml
3 plader	3.0 ml	30 ml
2 plader	2.0 ml	20 ml
1 plade	1.0 ml	10 ml

Forberedelse af vaske opløsning

Forbered den påkrævede mængde vaske opløsning ved fortynding af Wash Buffer 21X i redestilleret vand (1+20) i henhod til tabellen nedenfor. Bland grundigt.

Antal plader	Wash Buffer 21X	Redestilleret vand
10 plader	2 flasker	8000 ml
5 plader	180 ml	3600 ml
3 plader	110 ml	2200 ml
2 plader	70 ml	1400 ml
1 plade	35 ml	700 ml

Opbevaring efter fortynding: 2–8°C i 4 uger.

UDTAGNING OG HÅNDTERING AF PRØVER

Serum

Tag blod ved venepunktur, lad det koagulere, og adskil serummet ved centrifugering. Prøver kan opbevares ved 2–8°C i op til 24 timer. Længere opbevaring skal ske ved –20°C. Undgå at nedfryse og optø af flere omgange.

Plasma

Tag blod ved venepunktur i rør med heparin eller EDTA som antikoagulant, og adskil plasmafraktionen. Prøver kan opbevares ved 2–8°C i op til 24 timer. Længere opbevaring skal ske ved –20°C. Undgå at nedfryse og optø af flere omgange.

Forberedelse af prover

Fortynding er normalt ikke nødvendigt, men prœver, der indeholder >200 mU/l, skal fortyndes 1+9 v/v med Calibrator 0.

TESTPROCEDURE

Alle reagenser og prøver skal bringes til stuetemperatur før brug. Lav en kalibratorkurve for hver analysekørsel.

1. Klargør enzymkonjugatopløsning og vaske opløsning.
2. Klargør tilstrækkeligt med mikropladebrønde til Calibrators og prøver i dublet.
3. Pipetter 25 µl af både Calibrators og prøver i de relevante brønde.
4. Tilsæt 100 µl enzymkonjugatopløsning i hver brønd.
5. Inkuber på et rystebord (700-900 rpm) i 1 time ved stuetemperatur (18–25°C).
6. Vask 6 gange med 700 µl per brønd, anvend en automatisk pladevasker med overflow funktion. Benyt ikke soak funktion i vaske proceduren.
   Eller manuelt:
   Bortkast væsken i pladen ved at vende den på hovedet over en vask. Tilsæt 350 µl vaske opløsning til hver brønd. Bortkast vaske opløsningen, bank pladen flere gange mod absorberende papir for at fjerne overskydende væske. Gentag 5 gange. <u>Undgå at forlænge perioden hvor brøndene står med væske i løbet af vaskeperioden.</u>
7. Tilsæt 200 µl Substrate TMB.
8. Inkuber i 15 minutter ved stuetemperatur (18–25°C).
9. Tilsæt 50 µl Stop Solution hver brønd.
   Placer pladen på et rystebord i cirka 5 sekunder for at sikre blandingen.
10. Aflæs optisk densitet ved 450 nm, og beregn resultaterne.
    Aflæs inden for 30 minutter.

Obs! For att forhindre kontermination mellem konjugatet og substratet, anbefales det at anvende særskilte pipetter.

INTERN KVALITETSKONTROL

Kommercielle Kontroller som f.eks. Mercodia Diabetes antigen control (Kodenr. 10-1164-01) og/eller interne serumpuljer med lave, mellem og høje insulin-koncentrationer skal regelmæssigt analyseres som ukendte, og resultaterne afbildes fra dag til dag. Det er god laboratoriepraksis at registrere følgende data for hver analyse: sættets partinummer; rekonstitueringsdatoer for sættets komponenter; OD-værdier for blindprøver, Calibrators og kontrolprøver.

BEREGNING AF RESULTATER

Computerberegning

Computersturet datareduktion af absorbansen for Calibrators, bortset fra Calibrator 0, i forhold til koncentration ved hjælp af cubic spline-regression kan udføres for at opnå koncentrationen af insulin.

Manuel beregning

1. Plot de absorbansværdier, der er opnået for Calibrators, bortset fra Calibrator 0, mod insulin-koncentrationen på dobbeltlogaritmisk papir, og tegn en kalibratorkurve.
2. Aflæs koncentrationen for de ukendte prøver fra kalibratorkurven.

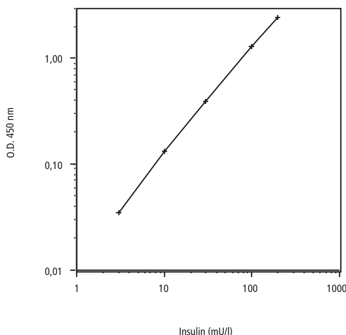
Eksempel på resultater

Brønde	Identitet	A_{450}	Gennemsnit konc.mU/l
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	0.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Ukendt 1	0.222/0.214	11.1
2 G–H	Ukendt 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Ukendt 3	1.941/1.978	153

* Koncentration angivet på hætteglassets etiket.

Exempel på kalibratorkurve

Der vises en typisk kalibratorkurve. Brug ikke denne kurve til at bestemme faktiske analyse-resultater.



KONVERTERINGSFAKTOR

1 µg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Som ved alle diagnosticeringsanalyser må en definitiv klinisk diagnose ikke baseres på resultatet af en enkelt analyse, men skal foretages af lægen, efter at alle kliniske resultater er blevet bedømt.

Anvendelsen af denne test på individer, der allerede er i insulinbehandling, kompliceres af dannelse af anti-insulin-antistoffer, der kan forstyrre analysen.

Stærkt lipæmiske, ikteriske eller hæmolyserede prøver forstyrrer ikke analysen.

FORVENTEDE VÆRDIER

God praksis foreskriver, at hvert laboratorium fastlægger sine egne intervaller for forventede værdier. Følgende resultater kan fungere som en vejledning, indtil laboratoriet selv har indsamlet tilstrækkelige data.

Fasteniveauer for 137 testede, tilsyneladende sunde individer gav et gennemsnit på 9,2 mU/l, en medianværdi på 6,9 mU/l og et interval, der svarer til de midterste 95% af observationerne på 2–25 mU/l.

YDEEVNE

Registreringsgrænse

Registreringsgrænsen er 1 mU/l, beregnet som to standardafvigelser over Calibrator 0.

Genfinding

Genfinding efter tilsætning er 94–113% (gennemsnit 104%).

Hook-effekt

Prøver med en koncentration på op til 30 000 mU/l kan måles uden at få falsk lave resultater.

Nøjagtighed

Hver prøve analyseres 6 gange ved 6 forskellige lejligheder.

Prøve	Gennemsnit mU/l	Variationskoefficient inden for analyse %	mellem analyse %	samlet analyse %
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Dansk

Specificitet

Der blev fundet følgende krydsreaktioner:

C-peptid	< 0.01%
Proinsulin	< 0.01%
Proinsulin des (31-32)	< 0.5%
Proinsulin split (32-33)	< 0.5%
Proinsulin des (64-65)	98%
Proinsulin split (65-66)	56%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003%
Insulin aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rotteinsulin	0.7%
Musinsulin	0.3%
Svininsulin	374%
Fårinsulin	48%
Bovine insulin	31%

KALIBRERING

Mercodia Insulin ELISA sættet er kalibreret mod den 1st International Reference Preparation 66/304.

GARANTI

De angivne ydeevnedata blev opnået ved af den angivne fremgangsmåde. Alle ændringer af fremgangsmåden, der ikke anbefales af Mercodia AB, kan påvirke resultaterne, og i dette tilfælde ophæver Mercodia AB alle garantier, det være sig udtrykkelige, stiltiende eller lovbefalede, herunder den stiltiende garanti for salgbarhed og egnethed til et bestemt formål.

I et sådant tilfælde kan Mercodia AB og dennes autoriserede distributører ikke drages til ansvar for indirekte skader eller følgeskader.

REFERENCER

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F. (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16: 179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742-2748

ANVÄNDNING

Mercodia Insulin ELISA är ett in vitro-test för kvantitativ bestämning av humant insulin i serum och plasma.

SAMMANFATTNING

Insulin är det hormon som reglerar glukosmetabolismen i kroppen. Det syntetiseras av betacellerna i bukspottkörteln via ett förstadium, proinsulin, som omvandlas till insulin genom avspjälkning av C-peptiden. Båda utsöndras i ekvimolära mängder i portablodet. Den mogna insulinmolekylen innefattar två polypeptidkedjor, A-kedjan och B-kedjan (21 respektive 30 aminosyror). De två kedjorna är sammankopplade genom två disulfidbryggor inom kedjorna. Det finns även en disulfidbrygga inom A-kedjan.

Utsöndring av insulin kontrolleras huvudsakligen av koncentrationen av plasmaglukos, och hormonet har ett antal viktiga metaboliska aktiviteter. Den viktigaste är att kontrollera upptagningen och användningen av glukos i perifera vävnader via glukostransportören. Denna och andra hypoglykemiska aktiviteter, såsom inhibering av hepatisk glukoneogenes och glykogenolys motverkas av de hyperglykemiska hormonerna som innefattar glukagon, epinefrin (adrenalin), tillväxthormon och cortisol.

Vid typ I-diabetes (insulinberoende diabetes, IDDM) saknas i princip insulin. Insulinnivån i serum är mycket låg och ökar inte vid stimulering med glukos. Vid hypopituitarism är insulinnivåerna likaledes mycket låga. Däremot finner man vid typ II-diabetes (åldersdiabetes, NIDDM) ofta normala eller t o m ökade insulinnivåer. Förhöjda insulinnivåer föreligger ofta vid fetma, insulinom och vissa endokrina dysfunktioner såsom Cushings syndrom och akromegali.

TESTPRINCIP

Mercodia Insulin ELISA är en fast fas enzym immunoassay som baserar sig på ”sandwich” teknik med två monoklonala antikroppar som är riktade mot separata antigena determinanter på insulinmolekylen. Under inkubation reagerar insulinet i provet med peroxidaskonjugerade anti-insulinantikroppar och anti-insulinantikroppar bundna till en mikrotiterbrunn. En enkel tvätt avlägsnar obunden enzyminmärkt antikropp. Det bundna konjugatet detekteras genom reaktion med 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB). Enzymreaktionen avläses spektrofotometriskt efter att ha stoppats genom tillsats av syra.

VARNINGAR OCH SÄKERHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro* diagnostiskt bruk.
- Innehållet i detta kit eller rester av det får inte komma i kontakt med idisslande djur eller svin.
- Stop Solution i detta kit innehåller 0,5 M H_2SO_4. Följ standardsäkerhetsåtgärder för hantering av farliga kemikalier.
- Alla patientprover skall hanteras som om de vore smittbärande.

MATERIAL SOM KRÄVS MEN EJ TILLHANDAHÅLLS

- Pipetter för 25, 50, 100, 200 och 1000 µl (repeterbara pipetter är att föredra för tillsats av enzymkonjugatlösning, Substrate TMB och Stop Solution)
- Bägare och mätglas för iordningställande av reagens
- Dubbeldestillerat vatten
- Mikrotiterplattläsare (450 nm filter)
- Plattskak (rekommenderad hastighet är 700-900 varv per minut, orbital rörelse)
- Tvättutrustning för mikrotiterplattor

REAGENSER 1X96

Varje Mercodia Insulin ELISA kit (10-1113-01) innehåller reagenser till 96 brunnar, tillräckligt många för 42 prov och en kalibratorkurva i duplikat. För större analysserier, använd sammanslagna reagenser från förpackningar med identiska lotnummer. Utgångsdatumet för hela kitet står på ytteretiketten. Rekommenderad förvaringstemperatur är 2–8°C.

Coated Plate (monoklonalt mus-anti-insulin)	1 platta Strips med 8 brunnar	96 brunnar	Färdig att användas
För oanvända mikrotiterplattbrunnar, återförslut påsen med tejp och använd inom två månader.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Koncentration angiven på flaskans etikett (rekombinant humant insulin) Gul färgmärkning	5 flaskor	1000µl	Färdig att användas
Calibrator 0 Gul färgmärkning	1 flaska	5 ml	Färdig att användas
Enzyme Conjugate 11X (peroxidaskonjugerat monoklonalt mus-anti-insulin)	1 flaska	1,2 ml	Späd enligt nedan
Enzyme Conjugate Buffer Blå färgmärkning	1 flaska	12 ml	Färdig att användas
Wash Buffer 21X	1 flaska	50 ml	
Späd ut med 1000 ml destillerat vatten för att göra tvättlösning. Förvaring efter utspädning: 2–8°C i 4 veckor.			
Substrate TMB Färglös vätska *Obs! Ljuskänslig!*	1 flaska	22 ml	Färdig att användas
Stop Solution 0,5 M H_2SO_4	1 flaska	7 ml	Färdig att användas

Beredning av enzymkonjugatlösning

Bered önskad mängd enzymkonjugatlösning genom att späda Enzyme Conjugate 11X (1+10) i Enzyme Conjugate Buffer enligt tabellen nedan. Vid beredning av enzymkonjugatlösning till hela plattan, hälls hela innehållet av Enzyme Conjugate Buffer i flaskan med Enzyme Conjugate 11X. Blanda varsamt. Använd inom en dag.

Antal strips	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strips	1 flaska	1 flaska
8 strips	700 µl	7.0 ml
6 strips	500 µl	5.0 ml
4 strips	350 µl	3.5ml

REAGENSER 10 X 96

Varje Mercodia Insulin ELISA kit (10-1113-10) innehåller reagenser för 10 x 96 brunnar, tillräckligt många för 42 prov och en kalibratorkurva i duplikat på varje platta. För större analysserier använd sammanslagna reagenser från förpackningar med identiska lotnummer. Utgångsdatumet för hela kitet står på ytterettiketten. Rekommenderad förvaringstemperatur är 2–8°C.

Coated Plate (monoklonalt mus-anti-insulin)	10 plattor Strips med 8 brunnar	96 brunnar	Färdig att användas
För oanvända mikrotiterplattbrunnar, återslut påsen med tejp och använd inom två månader.			
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Koncentration angiven på flaskans etikett	5 flaskor (rekombinant humant insulin)	1000 µl	Färdig att användas Gul färgmärkning
Calibrator 0 Gul färgmärkning	1 flaska	5 ml	Färdig att användas
Enzyme Conjugate 11X (Peroxidas konjugerat monoklonalt mus-anti-insulin)	1 flaska	12 ml	Späd enligt nedan
Enzyme Conjugate Buffer Blå färgmärkning	1 flaska	120 ml	Färdig att användas
Wash Buffer 21X	2 flaskor	200 ml	Framställs enligt nedan
Substrate TMB Färglös vätska. *Obs! Ljuskänslig!*	1 flaska	220 ml	Färdig att användas
Stop Solution 0,5 M H_2SO_4	1 flaska	70 ml	Färdig att användas

Beredning av enzymkonjugatlösning

Bered önskad volym enzymkonjugatlösning genom att späda Enzym Conjugate 11X (1+10) i Enzym Conjugate Buffer enligt tabellen nedan. Blanda varsamt. Använd inom en dag.

Antal plattor	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
10 plattor	1 flaska	1 flaska
5 plattor	5.0 ml	50 ml
3 plattor	3.0 ml	30 ml
2 plattor	2.0 ml	20 ml
1 platta	1.0 ml	10 ml

Beredning av tvättlösning

Bered önskad mängd tvättlösning genom utspädning av Wash Buffer 21X i destillerat vatten (1+20) enligt tabellen nedan. Blanda noggrannt.

Antal plattor	Wash Buffer 21X	Destillerat vatten
10 plattor	2 flaskor	8000 ml
5 plattor	180 ml	3600 ml
3 plattor	110 ml	2200 ml
2 plattor	70 ml	1400 ml
1 platta	35 ml	700 ml

Förvaring, efter utspädning: 2–8°C i upp till 4 veckor.

PROVTAGNING OCH HANTERING

Serum

Ta blod genom venpunktion, låt det koagulera, och separera serumet genom centrifugering. Prover kan förvaras vid 2–8°C i upp till 24 timmar. För längre tidsperioder, förvara proverna vid –20˚C. Undvik upprepad frysning och upptining.

Plasma

Ta blod genom venpunktion och sätt till rör innehållande heparin eller EDTA som motverkar koagulation och separera plasmadelen. Prover kan förvaras vid 2–8°C i upp till 24 timmar. För längre tidsperioder, förvara proverna vid –20˚C. Undvik upprepad frysning och upptining.

Provbehandling

Normalt sett behövs det ingen spädning, men prover som innehåller >200 mU/l bör spädas 1+9 v/v med Calibrator 0.

TESTETS UTFÖRANDE

Alla reagenser och prover måste rumstempereras före användning.
En kalibratorkurva ska ingå i varje analys.

1. Bered enzymkonjugatlösning och tvättlösning.
2. Gör i ordning tillräckligt många mikrotiterplattbrunnar för att rymma duplikat av Calibrators och prover.
3. Pipettera 25 µl vardera av Calibrators och prover i lämpliga brunnar.
4. Tillsätt 100 µl enzymkonjugatlösning till varje brunn.
5. Inkubera på en plattskak (700-900 rpm) i 1 timme vid rumstemperatur (18–25°C).
6. Tvätta 6 gånger med 700 µl per brunn, använd en automatisk microtiterplatt-tvätt med overflow-funktion. Använd inte soak-funktion vid tvättproceduren.
   Eller manuellt,
   Avlägsna reaktionslösningen genom att vända microtiterplattan upp och ner över en slask. Tillsätt 350 µl tvättlösning till varje brunn. Avlägsna tvättlösningen, knacka plattan bestämt flera gånger på absorberande papper för att ta bort överfödig vätska. Upprepa 5 gånger. <u>Undvik långvarig soak under tvättproceduren.</u>
7. Tillsätt 200 µl Substrate TMB till varje brunn.
8. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18–25°C).
9. Tillsätt 50 µl Stop solution till varje brunn.
   Placera plattan på en plattskak i ca 5 sekunder för att se till att lösningen blandas.
10. Avläs optisk densitet vid 450 nm och beräkna resultaten.
    Avläs inom 30 minuter.

Obs! För att undvika kontamination rekommenderas att separata pipetter används för konjugat och substrat.

INTERN KVALITETSKONTROLL

Kommersiella kontroller såsom Mercodia Diabetes antigen control (Kod nr. 10-1164-01) och/eller interna kontrollprover med låga, mellan och höga insulinkoncentrationer bör regelmässigt analyseras som okända och resultaten bör kartläggas dag för dag. Det tillhör goda laboratorierutiner att anteckna följande uppgifter för varje test: kitets lotnummer; kitkomponenternas rekonstitutionsdatum; OD-värden för blankvärde, Calibrators och kontroller.

BERÄKNING AV RESULTATEN

Datorberäkning

Kalibratorkurva kan konstrueras genom att använda "cubic spline regression" med absorbansvärdena för Calibrators, förutom Calibrator 0, mot insulin koncentrationen.

Manuell beräkning

1. Märk ut absorbansvärdena som erhålls för Calibrators, förutom Calibrator 0, mot insulin-koncentrationen på ett logpapper och konstruera en kalibratorkurva.
2. Avläs de okända provernas koncentration från kalibratorkurvan.

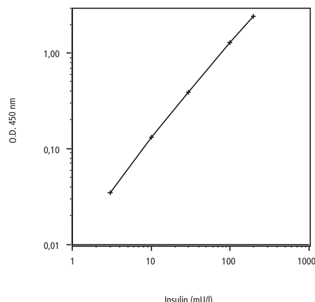
Exempel på resultat

Brunnar	Identitet	A_{450}	Medelkoncentration mU/l
1 A–B	Calibrator 0	0.070/0.071	
1 C–D	Calibrator 1 *	0.105/0.106	
1 E–F	Calibrator 2 *	0.202/0.204	
1 G–H	Calibrator 3 *	0.434/0.470	
2 A–B	Calibrator 4 *	1.348/1.351	
2 C–D	Calibrator 5 *	2.451/2.476	
2 E–F	Okänd 1	0.222/0.214	11.1
2 G–H	Okänd 2	0.546/0.538	35.6
3 A–B	Okänd 3	1.941/1.978	153

* Koncentrationen anges på flaskans etikett.

Exempel på kalibratorkurva

En typisk kalibratorkurva visas här. Använd inte den här kurvan för att fastställa verkliga testresultat.



OMRÄKNINGSFAKTOR

1 µg/l = 29 mU/l; 1 mU/l = 6.0 pmol/l

METODENS BEGRÄNSNINGAR

Liksom för alla andra diagnostiska tester, bör man inte basera en definitiv klinisk diagnos på resultaten från ett enstaka test. Diagnosen bör ställas av en läkare efter att alla kliniska fynd har utvärderats.

Det är svårare att tillämpa testet på individer som redan genomgår insulinbehandling på grund av bildning av anti-insulinantikroppar som kan påverka provresultatet.

Starkt lipemiska, ikteriska eller hemolyserade prover påverkar inte testresultatet.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det tillhör goda rutiner (good practice) att varje laboratorium skall etablera sin egen skala med förväntade värden. Följande resultat kan tjäna som vägledning till dess att laboratoriet har samlat tillräckligt med egna uppgifter.

Nivåer för 137 fastande, till synes friska testindivider, gav ett medelvärde på 9.2 mU/l, ett medianvärde på 6.9 mU/l och en spännvidd, som motsvarar de mittersta 95% av observationerna, på 2–25 mU/l.

ANALYTISKA PRESTANDA EGENSKAPER

Gräns för påvisbarhet

Detektionsgränsen är 1 mU/l beräknad som två standardavvikelser ovanför Calibrator 0.

”Recovery”

”Recovery” vid tillsats är 94–113% (medel 104%).

”Hook-effekt”

Prover med en koncentration på upp till 30 000 mU/l kan mätas upp utan att visa felaktiga låga resultat.

Precision

Varje prov analyserades sexfaldigt vid sex olika tillfällen.

Prov	Medelvärde mU/l	Variationskoefficient inom testet %	mellan testet %	totalt testet %
1	11	3.4	3.6	5.0
2	36	4.0	2.6	4.7
3	80	2.8	2.8	4.0
4	154	3.2	2.9	4.4

Specificitet

Följande korsreaktioner har hittats:

C-peptid	< 0.01%
Proinsulin	< 0.01%
Proinsulin des (31-32)	< 0.5%
Proinsulin split (32-33)	< 0.5%
Proinsulin des (64-65)	98%
Proinsulin split (65-66)	56%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lily)	< 0.000003
Insulin aspart	< 3.2%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Råttinsulin	0.7%
Musinsulin	0.3%
Grisinsulin	374%
Fårinsulin	48%
Bovint insulin	31%

KALIBRERING

Mercodia Insulin ELISA kit kalibreras mot 1st International Reference Preparation 66/304.

GARANTI

De presenterade uppgifterna från utförandet erhölls med användning av påvisat förfarande. Förändringar eller modifieringar av förfarandet som inte rekommenderas av Mercodia AB kan påverka resultaten. I dessa fall frånsäger sig Mercodia AB allt ansvar, underförstått såväl som lagstadgat, inklusive underförstådd säljbarhets- och användbarhetsgaranti.

Mercodia AB och deras auktoriserade distributörer skall i dessa fall inte hållas ansvariga för skador som orsakats indirekt eller som en konsekvens.

REFERENSER

Gaines-Das, R.E. and Bristow, A.F. (1988) WHO International reference reagents for human proinsulin and human C-peptide. *J Biol Stand* 16:179-186

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ. (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

Riserus U, Vessby B, Arner P, Zethelius B. (2004) Supplementation with trans10 cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* 47:1016-1019

Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

Sjostrand M, Gudbjornsdottir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lonnroth P. (2002) Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742-2748

SUMMARY PROTOCOL SHEET/ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLBLATTES/ FEUILLE DE PROTOCOLE RESUMEE/HOJA DE RESUMEN DEL PROTOCOLO/PROTOCOLLO DI SINTESI/OVERSIGTSPROTOKOLARK/SAMMANFATTNINGSPROTOKOLL

Mercodia Insulin ELISA

X-O Graf Tryckeri AB

Add Calibrators and samples 25 µl Calibrators und Proben beigeben Ajout de Calibrators et d'échantillons Añadir Calibrators y muestras Aggiungere Calibrators e campioni Tilsæt Calibrators og prøver Tillsätt Calibrators och prover	Incubate 15 minutes (18–25°C) Inkubieren 15 Minuten (18–25°C) Incubation 15 minutes (18–25°C) Incubar 15 min (18–25°C) Incubazione 15 minuti (18–25°C) Inkuber 15 min (18–25°C) Inkubera 15 minuter (18–25°C)
Add enzyme conjugate solution 100 µl Enzymkonjugatlösung beifügen Ajout du conjugué enzymatique Añadir la disolución de conjugado enzymático Aggiungere la soluzione enzima coniugato Tilsæt enzymekonjugatopløsning Tillsätt enzymekonjugatlösning	Add Stop Solution 50 µl Shake for 5 sec to ensure mixing Stop Solution beifügen 50 µl Sicherstellen von Durchmischung 5 Sek. schütteln Ajout de Stop Solution 50 µl Secouer pendant 5 secondes pour bien mélanger Añadir Stop Solution 50 µl Agitar durante 5 segundos para asegurar el mezclado Aggiungere Stop Solution 50 µl Scuotere per 5 secondi per assi curarsi che sia tutto mescolato Tilsæt Stop Solution 50 µl Ryst i 5 sekunder for sikre blanding Tillsätt Stop Solution 50 µl Skaka i 5 sekunder för att se till att lösningen blandas
Incubate 1 hour at 18–25°C on a shaker Inkubieren 1 Stunde auf einem Schüttler bei 18–25°C Incubation 1 heure à 18–25°C sur un agitateur secoueur de plaques Incubar 1 hora a 18–25°C en un agitador de placas Incubazione 1 ora a 18–25°C in una piastra shaker Inkuber 1 time ved 18–25°C på et rystebord Inkubera 1 timme vid 18–25°C på en plattskak	Measure A_{450} Messung A_{450} Mesure de A_{450} Medir A_{450} Misura A_{450} Aflæs A_{450} Mät vid A_{450}
Wash 6 times Waschen 6 mal Rinçage 6 rinçages Lavar 6 veces Lavare 6 volte Skyl 6 gange Tvätta 6 gånger	
Add Substrate TMB 200 µl Substrate TMB beigeben Ajout de Substrate TMB Añadir Substrate TMB Aggiungere Substrate TMB Tilsæt Substrate-TMB Tillsätt Substrate TMB	

31-3107
Revised 2009-05-05